Uppsala 1978

SNV PM 1036

Växtsubstansers deterrent- och repellentverkan på skadeinsekter

Biologi — kemisk analys — praktiskt utnyttjande

Natural plant chemicals acting as deterrents and repellents on pest insects

Biology — chemical analysis — practical applications

Lennart Lundgren
Bengt Å Andersson
Gunnar Stenhagen

1978

Rapport från
STATENS NATURVÅRDSVERK 1978

Föreliggande rapport grundar sig på arbeten utförda med ekonomiskt stöd från forskningsnämnden vid statens naturvårdsverk.

Författarna är ensamma ansvariga för rapportens innehåll, varför detta ej kan åberopas som representerande naturvårdsverkets ståndpunkt.

Solna i mars 1978

Statens naturvårdsverk
Forskningssekretariatet

Omslagsillustration av Nils Peterson ur författarnas artikel i Forskning och Framsteg 1978:3.

SNV PM 1036

SNV, Forskningsnämnden
Kontrakt nr 7-7/77

VÄXTSUBSTANSERS DETERRENT- OCH REPELLENTVERKAN PÅ SKADEINSEKTER

BIOLOGI - KEMISK ANALYS - PRAKTISKT UTNYTTJANDE

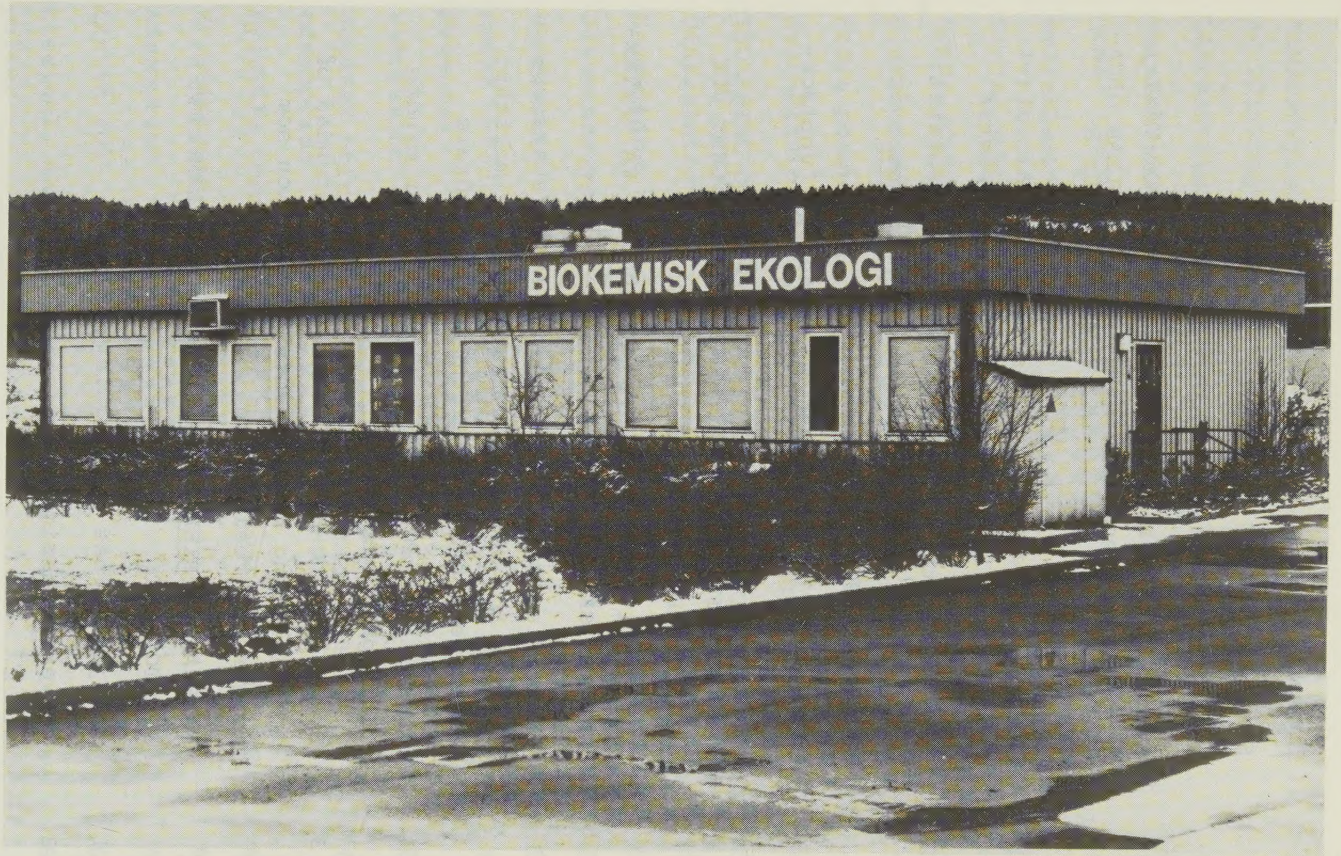
NATURAL PLANT CHEMICALS ACTING AS DETERRENTS AND REPELLENTS ON PEST INSECTS

BIOLOGY - CHEMICAL ANALYSIS - PRACTICAL APPLICATIONS

Lennart Lundgren
Bengt Å Andersson
Gunnar Stenhagen

GÖTEBORGS UNIVERSITET
Avdelningen för biokemisk ekologi
Kärragatan 6
431 33 MÖLNDAL Tel. 031/87 17 04, 27 28 21

UNIV.
LEIDEN
BIBL.


BIOKEMISK EKOLOGI

I n n e h å l l

		Sid
	Summary	9
	Sammanfattning	15
	INLEDNING	19
1.	VÄXTERNAS NATURLIGA KEMISKA FÖRSVAR MOT VÄXTÄGARE - EN PRODUKT AV SAMEVOLUTION MELLAN ORGANISMER	21
1.1	Svårupptäckta växters försvar, ett kvalitativt försvar med toxiner och beteendedeterrenter	21
1.2	Lättupptäckta växters försvar, ett kvantitativt försvar med substanser som gör näringen svårtillgänglig	26
1.3	Diskussion av hypotesen om växternas "upptäckbarhet"	27
2.	ORSAKER TILL KULTURVÄXTERNAS MOTTAGLIGHET FÖR SKADEGÖRARE I MODERNT JORDBRUK	29
3.	ALTERNATIVA KONTROLLMETODER GRUNDADE PÅ VÄXTERNAS KEMISKA FÖRSVAR	30
3.1	Identifiering och utnyttjande av försvarssubstanser hos växter som framgångsrikt motstått angreppen från våra kulturväxtskadegörare	30
3.2	Utarbetande av odlingsmetoder som ger mindre lättupptäckbarhet	31
3.3	Framställning av resistenta sorter grundad på identifiering av den kemiska variation som bygger upp resistensen	32
4.	KÅLFJÄRIL (PIERIS BRASSICAE) - ETT LÄMPLIGT PILOTOBJEKT	34
4.1	Kålfjärilarnas äggläggning	35
4.2	Larvernas näringsval	35

5.	UTARBETANDE AV TEKNIK FÖR ODLING AV FÖRSÖKSDJUR ÅRET RUNT	37
6.	KONSTRUKTION AV TVÅVALSKAMMARE FÖR BETEENDETEST AV VÄXTSUBSTANSER	44
7.	LABORATORIEPRÖVNING AV GAMLA BONDEKNEP	45
7.1	Beteendetestens utformning	46
7.2	Tomat (Solanum lycopersicum)	48
7.3	Gyllenlack (Cheirantus cheirii)	50
7.4	Timjan (Thymus vulgaris)	51
7.5	Lomme (Capsella bursa pastoris)	52
7.6	Fläder (Sambucus nigra)	52
7.7	Andra potentiella deterrentväxter	53
7.8	Kvarhållare av flyktiga växtsubstanser	53
8.	ISOLERING OCH KONCENTRERING AV ALLELOKEMIKALIER	56
8.1	Destillation	57
8.2	Extraktion	57
8.3	Direktanalys	58
8.3.1	Headspace	58
8.3.2	Andra metoder för direktanalys av biologiskt material	59
8.4	Utfrysning (kondensering)	60
8.4.1	Separat utfrysning följd av extraktion eller adsorption	60
8.4.2	Kylfälla omedelbart före adsorptionssteget med GC	61
8.4.3	Frystorkning	61
8.5	Adsorption	61
8.5.1	Aktivt kol	62
8.5.2	Kiselgel, magnesiumoxid, aluminiumoxid, cellulosa-pulver	64

8.5.3	Högkokande vätskor	64
8.5.4	Syntetiska fasta polymerer	66
9.	SEPARATION OCH IDENTIFIERING AV VÄXTSUBSTANSER MED SPECIELLT ANPASSAD GC-MS	68
9.1	Åtgärder för ökning av ett GC-MS-instruments prestanda	68
9.1.1	GC-MS-instrumentets känslighet	68
9.1.2	Gaskromatografens separationsförmåga	69
9.2	Beskrivning av ett GC-MS-instrument speciellt uppbyggt och anpassat för analys av växtsubstanser	70
9.2.1	Gaskromatografen	70
9.2.2	Glaskapillärkolonnen	70
9.2.3	Insläppssystemet till GC	71
9.2.4	Koppling kapillärkolonn-masspektrometer	72
9.2.5	Beskrivning av masspektrometern	73
9.2.6	Registrering av gaskromatogrammet	74
9.2.7	Konstruktion av massmarkerare med linjär masskala	75
10	ANALYSMETODIK OCH ANALYSRESULTAT	78
10.1	Utvärdering av den med växtobjektet timjan utformade analysmetodiken	80
10.2	Synpunkter på växternas försvarskemi med utgångspunkt från timjanresultaten	82
10.3	Metodikens tillämpbarhet på andra växter- lomme (Capsella bursa pastoris) åbrodd (Artemesia abrotanum) tomat (Solanum lycopersicum) gyllenlack (Cheirantus cheirii) fläder (Sambucus nigra)	84

11	VÄXTÄTARNAS SJÄLVKONTROLL MOT ÖVEREXPLOATERING AV NÄRINGSTILLGÅNGARNA	86
11.1	Påvisande av äggutspridningsferomoner hos kålfjäril	86
11.2	Identifiering av från äggen frigjorda substanser	87
11.3	Beteendetest av äggsubstanserna	88
12	PRAKTISKT UTNYTTJANDE AV VÄXTERNAS FÖRSVARS-SUBSTANSER MED DET KEMISKA TOTALFÖRSVARET SOM UTGÅNGSPUNKT	90
12.1	"Läckogram" och "sårogram"	90
12.2	Växternas kemiska självförsvar- en naturlig grund för integrerad kontroll	92
13	STRATEGI FÖR DET FORTSATTA ARBETET	93
13.1	Samarbete med resistensförädlare	93
13.2	Tänkbara målarter för en kontroll av skade-görare med naturliga växtsubstanser	94
13.3	Antimikrobiella ämnen från högre växter	96
13.4	Miljökonsekvenser av växternas allelokemikalier	96
13.5	Förbättring av de tekniska möjligheterna till tolkning av växternas försvarskemi	97
	SLUTORD	99
	LITTERATURFÖRTECKNING	100
	FIGURER	124
	TABELLER	167

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548915_0004

NATURAL PLANT CHEMICALS ACTING AS DETERRENTS AND REPELLENTS ON PEST INSECTS

Lennart Lundgren
Bengt Å. Andersson
Gunnar Stenhagen

Department of Biochemical Ecology, Kärragatan 6,
S-431 33 Mölndal

Summary

Plants have a manifold production of secondary compounds. From evolutionary point of view they are allelochemics i.e. chemical signals between different species. A scheme has been constructed to visualize the allelochemic communication net of the organism world. A proposal is made for a uniform terminology for allelochemics. These chemicals constitute the chemical self-defence of the plants against herbivores. A management of pest populations below the economic threshold demands an integrated pest control. This project is built on the thesis that an optimally designed chemical self-defence, properly used with selected combinations of crops and suited farming methods, if required strengthened with applied defence chemicals from other plants, is a model for pest management which deserves to be systematically tested.

A pattern is beginning to be recognized in the distribution of plant allelochemics. The importance of "the hypothesis of apparency" is discussed. Accordning to this hypothesis the plants can be classified into "apparent plants" and "unapparent plants" in accordance with their availability to enemies in time and space. The production of defence substances can be supposed to involve metabolic costs which affect the competition ability of the plants in other respects. Herbs in young plant communities are unapparent but live in a hard competition situation which has favoured the development of a metabolically cheap chemical defence with small quantities of toxins and behaviour deterrents. Apparent plants such as tree species in climax vegetation are protected by rather large quantities of chemicals (e.g. tannins) which make the nourishment unaccessible to plant feeders. The assumption that the defence substances are concentrated when and where they are best needed is supported by empirical facts. We are convinced that this hypotheses is an important milestone on the way to a practical utilizing of the general theory of coevolution between organisms. One example of that is the conclusions which can be drawn about reasons for the severe pest problems in modern agriculture. The natural chemical defence of plants consists of: 1) chemical diversity most

effectively consisting of several chemical types of defence which obstruct the counter adaptation of the herbivores, 2) chemical originality compared to other surrounding species, 3) ability to change the chemical defence through a fast evolution, 4) associational resistence i.e. side effects of the chemical defence of other plants, 5) nutritional incompleteness from the herbivore point of view. Most cultivated plants are herbs and in their natural environment unapparent. We have made them apparent by breeding them in monocultures and at the same time a plant breeding for better productivity has reduced the total contents and diversity of allelochemics.

The large white (Pieris brassicae), the green-veined white (P. napi) and the small white (P. rapae) where chosen as specially suited pilot objects for this investigation. When using allelochemic deterrents and repellents to protect cultured plants these substances are acting in competition with the attractants and the stimulants of the food plants. An important reason for choosing these species is that the oviposition behaviour of the cabbage butterflies and the feeding behaviour of the larvae are thouroghly investigated. The chemical structure of the behaviour releasing plant chemicals is also known. These three butterfly species do not belong to the most important pests in Sweden. 110 out of 848 professional breeders which answered a letter inquiry estimated the average crop reduction to 15 % in spite of vaste use of pesticides.

A labour-saving breeding technique has been designed. The larvae are fed on a modified semi-synthetic diet. Test animals are produced all over the year in the insectarium. Successful results with the breeding of blues (Lycaeninae) suggests that the technique is useful also for other insects.

A dual-choice chamber has been constructed. This work has involved a continuous development of new models. Model V enables an estimation of threshold values and combination effects for volatile chemicals as the amount of released substance per time unit and the air flow through the apparatus are known.

From a practical point of view oviposition deterring chemicals are of a special interest as they are active before the plant has been attacked. From the literature and from breeders´ experiences a list of 25 potential oviposition deterring plants has been compiled.

Odour from the lipid fraction from young tomato shoots (Solanum lycopersicum) reduces the oviposition in P. brassicae.

The water phase of this plant extract has more effective oviposition deterrents acting on contact chemo-receptors. Linalol, trans-hex-2-enal and cis-hex-3-en-1-ol contribute to this tomato effect. Leaf juice from Cheiranthus cheirii and Sambucus nigra do also reduce the egg load when painted on a cabbage leaf. In Cheiranthus has 3-metyltioproprylisothiocyanat been identified. This substance has not yet been behaviour tested. The main component in the Sambucus odour is benzaldehyd which tends to be an attractant to egglaying females of P. napi. Thymus vulgaris and T.serpyllum have a weak deterring effect on the oviposition of the large white.

The chemical plant defence consists of a triple defence wall, namely chemicals spontanously emitted from the plant to the environment, a surface layer of taste substances, and chemicals released when the plant is wounded. The released defence substances are often volatiles, which are diluted in the environment and it is therefore necessary to isolate these before the chemical analysis. The most sensitive technique for this analysis is the combination capillary gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) which both separates and analyses a mixture of volatiles. As the defence substances are often present in minute amounts, a concentration step has to be inserted before the GC-MS analysis. A survey of literature of isolation and concentration methods showed that a direct analysis of a sample naturally gives the best result if the sample components are present in measurable quantities. If a concentration step has to be introduced adsorption on high boiling liquids and synthetic solid polymers gives the best results concerning reproducibility and avoiding artefacts. Besides the adsorption technique is very easy to integrate into the GC-MS system. At our department we have designed a specially adapted GC-MS instrument with very high separation capacity, high sensitivity and mild sample conditions through a specially designed inlet system equipped with a cold trap, very sensitive total ion registration with discrimination of ions from the carrier gas. To facilitate the evaluation of mass spectra a massmarker with linear masscale has been developed. An adsorption apparatus with airflow and temperature controls has been constructed. Different adsorption materials such as GC-stationary phases and synthetic solid polymers have been tested on the plant object thyme (Thymus vulgaris). The adsorption is performed with a glass sampling tube equipped with a suitable adsorbent. The adsorbed odour can therefore be kept in a deepfreezer under inert conditions. This makes the analysis step independent of time and space.

Although thyme has only a weak deterrent effect on egg-laying cabbage butterflies, this plant has been chosen as model object to evaluate a suitable method for isolation,

concentration and analysis of the allelochemics of plants. The reason is partly that thyme has a broad production of substances with different polarity and volatility, partly that a literature search has shown that thyme has been subject to a great number of chemical investigations which gives a good support to our results.

Direct condensation of the spontaneously released plant substances gives the best picture of the emitted plant substances. However, with this method certain difficulties at the analysis may occur which can be solved by using the adsorption methods. One problem is the presence of water which interferes with the most volatile fractions. Here adsorption to synthetic solid polymers such as TENAX has proved to be useful as TENAX only adsorbs water in neglective quantities. Another problem is that molecules with low volatility appear in very low concentration when the direct method is used. Adsorption to GC-stationary phases such as SE-30 and XE-60 increases the concentration of these molecules at the GC-MS-analysis and facilitates the identification.

Observations and experiments by Rothschild and Schoonhoven show that odorous and visual signals helps the females of P.brassicae not to overload a certain food plant. Such egg dispersal pheromones are certainly also of practical interest for pest control. As a part of a collaboration with these scientists butter acid, linalol, Δ3-carene and limonene have been identified as components of the egg odour.

Our results well illustrate the almost frustrating diversity of allelochemics in the plants. An investigation of the chemical background to the behaviour repressing effect of a plant species neccitates a vast chemical identification work and a great number of behaviour tests. A solution to these problems may instead be to try to map the chemical total defence of the plant. To be able to use a plant as food a herbivore must cope with the whole chemical arsenal of the plant. The plants "leak" organic chemicals both beneath and above the ground surface. To a great extent these substances are absorbed by other organisms. The behaviour repressors which protect the plant ought to have been selected among these "leak chemicals". We have used the terms "leakogram" and "woundogram" to describe a survey picture of the chemicals which are emitted by the plant spontaneously and after it had been wounded. Gas capillary chromatograms of the type presented in this work can be used as leakograms and woundograms. Without identification of the components they are of practical interest for plant breeders among others when they screen a large plant material and at an evaluation of the chemical background of different resistance types. This may also be a suitable

diagnosis technique to avoid destroying the chemical diversity when we create new monocultures such as energy forests. The development of better methods of analysis of allelochemics is also necessary to satisfy the demand for specification of chemical changes in plants caused by plant breeding.

VÄXTSUBSTANSERS DETERRENT- OCH REPELLENTVERKAN PÅ SKADEINSEKTER

Lennart Lundgren
Bengt Å Andersson
Gunnar Stenhagen

Avdelningen för Biokemisk Ekologi,
Kärragatan 6, 431 33 Mölndal

Sammanfattning

Växterna har en rik produktion av s k sekundära substanser. Utvecklingsmässigt är dessa ämnen allelokemikalier, dvs kemiska signaler mellan olika arter. Ett schema har uppställts för att visualisera det allelokemiska kommunikationsnätet i organismvärlden. Ett förslag framförs till en enhetlig terminologi för dessa föreningar. Allelokemikalierna utgör bl a växtens kemiska självförsvar mot växtätare. En reglering av skadedjurspopulationerna (pest management) under den ekonomiska skadetröskeln kräver en samordning av olika kontollmetoder (integrated pest control). Projektet bygger på tesen att ett optimalt utformat kemiskt självförsvar rätt utnyttjat genom utprövade grödekombinationer och lämpliga brukningsmetoder, vid behov förstärkt med utifrån applicerade försvarssubstanser från andra växter, är en modell för reglering av skadegörande växtätarpopulationer som förtjänar att systematiskt prövas.

Man börjar nu urskilja ett mönster i fördelningen av växternas allelokemikalier. Betydelsen av den s k "upptäckbarhetshypotesen" diskuteras. Enligt denna kan växterna efter sin tillgänglighet för angripare i tid och rum indelas i "svårupptäckta växter" (unapparent) och "lättupptäckta växter" (apparent). Produktionen av försvarssubstanser kan antas medföra ämnesomsättningskostnader som påverkar växtens konkurrensförmåga i andra avseenden. Örtartade växter i unga växtsamhällen är svårupptäckta men lever i en hård konkurrenssituation som främjat utveckling av ett ämnesomsättningsbilligt kemiskt försvar med små mängder av toxiner och beteendedeterrenter. Lättupptäckta växter, t ex träd i s k klimaxvegetation skyddas av tämligen stora mängder av ämnen (bl a garvämnen) som gör näringen svårtillgänglig för växtätarna. Antagandet att försvarssubstanserna koncentreras där och då de bäst behövs stöds av empiriska fakta. Vi är övertygade om att denna hypotes utgör en milstolpe på vägen mot ett praktiskt utnyttjade av den allmänna teorin om samevolution mellan organismer. Ett exempel är de slutsatser som kan dras om orsaker till de omfattande skadedjursangreppen i modernt jordbruk. Växternas naturliga kemiska försvar består av: 1) Kemisk mångfald, helst bestående av flera olika försvarslinjer som försvårar växtätarnas motanpassning, 2) Kemisk originalitet jämfört med andra samväxande

arter, 3) Förmåga till snabb utveckling, dvs förändring av det kemiska försvaret, 4) Associationell resistens, dvs åtnjutande av sidoeffekter från andra växters försvarssubstanser, 5) Näringsmässig obalans ur växtätarens synpunkt. De flesta kulturväxter är örtartade och i naturligt tillstånd svårupptäckta. Vi har gjort dem lättupptäckta genom odling i monokulturer samtidigt som en produktivitetsinriktad växtförädling minskat totalhalten och variationsrikedomen av allelokemikalier.

Kålfjäril (Pieris brassicae), rapsfjäril (P. napi) och rovfjäril (P. rapae) har bedömts vara speciellt lämpade pilotobjekt för denna undersökning. Vid ett utnyttjande av allelokemikalier med repellent- och deterrentverkan för att skydda odlade växter kommer dessa substanser att verka i konkurrens med värdväxtens naturliga attrahenter och stimulanter. Ett viktigt argument är därför att kålfjärilarnas äggläggningsbeteende samt larvernas ätbeteende är väl undersökta och de beteendeutlösande växtsubstansernas kemiska struktur känd. Dessa tre fjärilsarter tillhör inte de ekonomiskt mest betydande skadegörarna i Sverige. 110 yrkesodlare av 848, som besvarade en brevenkät, uppskattade, trots användningen av en rad biocider, det genomsnittliga skördebortfallet till ca 15 %.

En arbetsbesparande teknik har utformats med uppfödning av larverna på ett modifierat halvsyntetiskt foder. Odlingen ger tillgång till försöksdjur under hela året. Lyckade resultat med svårodlade blåvingar (Lycaeninae) pekar på att tekniken är användbar även för andra insekter.

Tvåvalkammare har konstruerats för test av allelokemikaliernas beteendeeffekter. Arbetet har inneburit en successiv modellutveckling. Modell V möjliggör en uppskattning av tröskelvärden och kombinationseffekter i och med att man känner per tidsenhet avgiven substansmängd och luftflödet genom kammaren.

Ur praktisk synpunkt är givetvis äggläggningsavskräckande substanser av speciellt intresse därför att de griper in innan angreppet sker. På grundval av litteraturuppgifter och uppgifter från odlare har en lista på 25 olika äggläggningsdeterrentväxter för kålfjäril sammanställts.

Doft från lipidfraktionen i tomatskott (Solanum lycopersicum) nedsätter äggläggningen hos kålfjäril. I vattenfasen finns effektivare äggläggningsdeterrenter med kontaktverkan. Linalol, trans-hex-2-enal och cis-hex-3-enol-1 bidrar till tomateffekten. Bladsaft från gyllenlack (Cheiranthus cheirii) och fläder (Sambucus nigra) nedsätter också äggläggningen. I gyllenlack har 3-metyltiopropyl-isotiocyanat identifierats, men ännu inte beteendetestats. Huvudkomponenten i doften från fläder, benzaldehyd, verkar attraherande på äggläggande honor av rapsfjäril. Trädgårdstimjan (Thymus vulgaris) och backtimjan (T. serpyllum) har svag deterrentverkan på äggläggningen hos kålfjäril.

Växternas kemiska försvar utgöres av en tredubbel försvarsmur, nämligen de substanser som avges från växten till omgivningen, ett ytskikt av smaksubstanser samt de ämnen som frigörs när växten skadas. De avgivna försvarssubstanserna är ofta flyktiga, de avges från växten och sprids ut i omgivningen, varför det gäller att isolera dessa före en kemisk analys. Den mest känsliga tekniken för denna analys är kombinationen kapillärgaskromatografmasspektrometer (GC-MS), vilken både separerar och analyserar en blandning av flyktiga föreningar. Ofta föreligger föreningarna i så låg koncentration att ett koncentreringssteg måste införas före GC-MS-analysen. En litteraturundersökning av isolerings- och koncentreringsmetodik ger vid handen att en direkt analys av ett prov givetvis ger det bästa analysresultatet om de ingående föreningarna i provet finns i tillräcklig mängd. Däremot ger kondensering i kylfälla, adsorption på högkokande vätskor och syntetiska fasta polymerer de bästa resultaten vad beträffar reprocerbarhet och undvikande av artefakter, om ett koncentreringssteg måste införas. Dessutom är adsorptionstekniken mycket lätt att koppla till GC-MS. Vid avdelningen har ett speciellt anpassat GC-MS-instrument byggts med mycket hög separationsförmåga, hög känslighet och milda provbetingelser genom ett speciellt insläppssystem med kylfälla, känsligare totaljonregistrering med diskrimering av bärgasjoner. För lättare utvärdering av masspektra har en massmarkerare med linjär massskala konstruerats. Adsorptionsapparatur med kontroll av flöde och temperatur har utvecklats. Olika adsorptionsmedel, t ex stationära faser och syntetiska fasta polymerer, har testats på växtobjektet timjan (Thymus vulgaris). Koncentreringen göres via en provkapsel med lämpligt adsorptionsmedel. Den adsorberade doften kan på så sätt förvaras i frys under inerta konditioner. Detta gör att analyssteget kan utföras oberoende av tid och rum. Trots att timjan har endast en svag deterrentverkan på äggläggande kålfjärilar har denna växt valts som modellobjekt vid utarbetandet av en lämplig metod för isolering, koncentrering och analys av växternas allelokemikalier. Orsaken är dels att timjan har en bred produktion av substanser med olika polaritet och flyktighet, dels att en litteraturundersökning visat att timjan varit föremål för ett stort antal kemiska undersökningar, vilket ger ett rikt referensmaterial för våra resultat.

Direkt kondensering av de spontant från växten avgivna substanserna ger den riktigaste bilden av de ämnen som växten utsöndrar. Här uppträder emellertid vissa svårigheter vid analysen som adsorptionsmetoderna kan lösa. Ett problem är närvaron av vatten vid analysen som påverkar vissa flyktiga fraktioner. Adsorption på syntetiska fasta polymerer, som t ex TENAX har visat sig användbar i detta avseende då TENAX inte adsorberar vatten. Ett annat problem är att substanser med lägre flyktighet uppträder i mycket låga halter vid direktmetoden. Adsorption på sta-

tionära faser som t ex SE-30 och XE-60 framhäver de mindre flyktiga ämnena påtagligt och identifikationen underlättas.

Iakttagelser och försök av Rotschild och Schoonhoven visar att doftsignaler och visuella stimulii från ägg och larver hjälper kålfjärilshonorna att undvika överbeläggning av en viss värdväxtplanta. Sådana äggutspridningsferomoner är givetvis också av praktiskt intresse ur kontrollsynpunkt. Som ett led i ett samarbete med dessa forskare har smörsyra, linalol, Δ 3-caren och limonen strukturbestämts som komponenter i äggdoften hos P. brassicae.

Vårt resultat illustrerar väl den nästan frustrerande mångfald av allelokemikalier hos växterna. Kartläggningen av deterrentverkan hos en viss växt innebär ett omfattande kemiskt identifieringsarbete och ett stort antal beteendetest. Slutsatsen blir att det finns skäl att i stället söka kartlägga det kemiska totalförsvaret. Det är detta som en växtätare måste klara för att utnyttja växten som värd. Växten "läcker" organiska substanser både under och ovan jord. I stor utsträckning tas dessa ämnen åter upp av levande organismer. De repressorer som skyddar växten bör ha selekterats bland dessa ämnen. Vi har använt termerna "läckogram" och "sårogram" för att beteckna en översiktsbild av de ämnen som avges från växten, spontant och när växten såras. Kapillärkromatogram av den typ som presenteras i detta arbete bör kunna användas som läckogram och sårogram och även utan strukturbestämning av de olika komponenterna vara av praktiskt värde för bl a växtförädlaren vid sållning av ett växtmaterial och vid jämförelse mellan olika resistena typer. Detta bör också vara en lämplig diagnosteknik för att undvika försvarskemisk utarmning av nya monokulturer av typ energiskogar. Utveckkling av bättre metoder för analys av allelokemikalier krävs också för att uppfylla de krav som ställs på en kemisk specifikation av de förändringar som orsakas av växtförädlingen.

INLEDNING

Trots att ekosystemtänkandet intar en framskjuten plats inom modern ekologi så förtjänar det att påpekas att växterna, förutom att genom sin fotosyntes reglera energiflödet genom ekosystemen, dessutom som allroundkemister svarar för merparten av den biokemiska variationen inom biocönoserna. De av växterna syntetiserade substanserna ger via näringskedjorna djuren material för en rad livsfunktioner, som tycks omfatta även djurens signalsystem på såväl sändare- som mottagaresida. Växterna är t ex ensamma om att kunna framställa karotenoider. Karotenoidtillförseln är nödvändig för synen hos både däggdjur (A-vitamin - retenin) och insekter. Djurens intra- och interspecifika färgsignaler är också i stor utsträckning karotenoidbaserade. Indicier föreligger på att även luktsinnet och smaksinnet är karotenoidberoende (1). De avskräckande (aposematiska) signaler, som tolkas av dessa sinnen, emanerar i sin tur också huvudsakligen från växternas syntesverksamhet (2).

Vilket är då växternas eget naturliga försvar? Växtätarnas näringsval bestäms inte i första hand av olika växters innehåll av nödvändiga näringsämnen (primära substanser). I själva verket har "ättrycket" från växtätarna medfört att de flesta växter är ur växtätarens synpunkt näringsmässigt obalanserade. Detta försvar från växtens sida kompletteras av en rik biokemisk fabrikation av sekundära substanser (utan påvisbar betydelse för växtens egen ämnesomsättning), som genom olika beteendeutlösande effekter bestämmer att växten ifråga äts (attrahenter, stimulanter) eller inte äts (repellenter, deterrenter). Växtens eget naturliga försvar är således ett kemiskt försvar.

"Liv är kemikalier i balanserad samverkan". När det gäller en ekologiskt riktig kontroll av skadegörare går således gränsen mellan "önskvärt" och "icke önskvärt" inte mellan "kemikalier" och "icke kemikalier" utan mellan molekyler omstrukturerade och utvalda under samevolution mellan

organismgrupper och nyfabricerade molyler utan motsvarande långtidsprövning i naturen.

Målet är idag att utifrån kunskap om våra jordbruksekosystem reglera skadedjurspopulationerna så att de hålls under den ekonomiska skadetröskeln för de olika arterna. En sådan reglering (pest management) kräver en noggran samordning av olika kontrollmetoder (integrated pest control).

Växtförädlingen är historiskt en produktivitets- och smakkvalitetsforskning. Resistensförädling har tillgripits först när andra bekämpningsmetoder sviktat. Den har nu fått ett förnyat intresse till följd av att kostnaderna för insecticidbekämpning och framställning av nya insecticider rusat i höjden. Växternas naturliga försvarssubstanser är fortfarande de minst utforskade biologiska signalsubstanserna, trots att de borde utgöra en självklar grund för en integrerad kontroll. Ett optimalt utformat kemiskt självförsvar, rätt utnyttjat genom lämpliga brukningsmetoder och utprövade grödekombinationer, vid behov förstärkt med utifrån applicerade försvarssubstanser från andra växter, är en modell för reglering av de skadegörande växtätarpopulationerna genom "hjälp till självhjälp" som förtjänar att systematiskt prövas.

1. VÄXTERNAS NATURLIGA KEMISKA FÖRSVAR MOT VÄXTÄTARE - EN PRODUKT AV SAMEVOLUTION MELLAN ORGANISMER

Föreliggande projekt utgör ett försök att praktiskt utnyttja en alltmer precist formulerad (3,4,5,6,7,8) och allmänt accepterad teori om samevolution mellan insekter och växter. Växter och insekter är invecklade i en utvecklingsmässig kapprustning. Växterna avsätter en del av ämnesomsättningsbudgeten till kemiskt försvar och insekterna måste offra en del av upptagen energi och näring på värdfinnande och "attack". Projektet är tills vidare inriktat på insekt:växt-relationer, men även andra växtätande organismer är invecklade i denna kemiska samevolution.

Skillnader finns i olika insekters näringsbehov, men det finns föga skäl att anta att variationer i olika växtarters innehåll av "primära substanser", ingående i den basala ämnesomsättningen, bestämmer insektens val av näringsväxt. Monofaga arter härstammar inte heller självklart från polyfaga arter med många näringsväxter.

Växterna innehåller också ett brett spektrum av s k "sekundära substanser" till synes utan fysiologisk betydelse för de arter som producerar dem. Ett mycket stort antal sådana föreningar tillhörande ämnesgrupper som alkaloider, cyanoglykosider, saponiner, tanniner, flavonoider, terpener o s v, förekommande hos vissa växtfamiljer, släkten eller enstaka arter, har tidigare beskrivits utan att deras roll i växternas ämnesomsättning tillfredsställande kunde förklaras. Trots att vår kunskap om växternas kemiska sammansättning i mycket ringa utsträckning satts i relation till insekternas beteende, har under de senaste åren sekundära växtsubstanser av olika slag visat sig påverka växtätarnas livsduglighet (9,10,11,12,13,14). Detta gör att den ursprungliga "avfallsprodukts- och upplagsnäringshypotesen" måste överges som förklaring för de sekundära växtsubstansernas existens.

De sekundära växtsubstanserna är således inte av sekundär betydelse för växterna. Whittaker (10) har föreslagit termen allelokemikalier för kemiska mellanartssignaler som påverkar tillväxt, hälsa eller populationsbiologi hos individer av en annan art. Tabell 1 är ett försök att visualisera mångfalden av allelokemiska mellanartssignaler. De högre växternas kemiska försvar mot växtätare (den inramade rutan i schemat) är som synes bara en liten del av det kemiska kommunikationsnätet i ekosystemen.

De kemiska signalsystemen skulle vara lättare överblickbara om en enhetlig terminologi utformades. Brown et. al. (16) baserade en indelning av allelokemikalierna på deras anpassningsvärde. Allomoner är positiva för den avgivande organismen och kairomoner är av värde för den mottagande organismen. En annan möjlighet är att relatera terminologin till det biologiska fenomen som påverkas, vilket kan vara ett beteendemönster, en fysiologisk process eller en utvecklingsprocess. De bästa förslagen i den riktningen har gjorts av Dethier et. al. (17) och Beck (18). Lindstedt (19) har modifierat denna terminologi för att gälla de kemiska signaler som styr ätbeteendet. I tabell 2 har vi utvidgat denna terminologi till en generell terminologi för alla allelokemikalier. De flesta biologiska och tekniska reglersystem innefattar mot varandra verkande positiva och negativa stimuli, vilka här med ett gemensamt namn kallas aktivatorer och repressorer. Effekten av repressorer är mer påfallande och ofta av praktiskt intresse för människan. Detta är troligen förklaringen till att dessa allelokemikalier har givits egna namn t ex allelopatiska ämnen, antibiotika, marasminer, koliner, fytoncider och fytoalexiner (20, 21). Den i tabell 2 föreslagna terminologin är till stor del också användbar för feromoner, d v s kemiska inomartssignaler.

En växts bästa försvar mot växtätare är att bli oätlig

eller på annat sätt avskräckande. Den rikhaltiga arsenalen av sekundära växtsubstanser även hos de primitivaste av de nu levande formerna utgör utan tvivel en väsentlig förklaring till de gömfröiga växternas ställning som nutidens framgångsrikaste växtgrupp. De sekundära växtsubstansernas beteendeutlösande effekter reglerar de rikt differentierade relationerna i samspelet - växtätande insekter : näringsväxter : icke näringsväxter. Efter den beteendeutlösande effekten kan de sekundära växtsubstanserna indelas i (jämför tabell 2):

attrahenter - ämnen som orsakar orienteringsrörelser mot retningskällan

arrestanter - ämnen som utlöser icke riktade svar som verkar ansamlande t ex genom att nedsätta den linjära rörelsehastigheten

incitanter - ämnen som utlöser påbörjande av beteendet

stimulanter - ämnen som medför fortsatt äggläggning eller ätande

repellenter - ämnen som orsakar orienteringsrörelser från retningskällan

deterrenter - ämnen som inhiberar äggläggning eller ätande där äggläggning eller ätande annars skulle ske

Växtätarna ligger således bakom den biokemiska mångfald som växterna uppvisar. Allelokemikalierna utövar primärt en repressorverkan på insekternas beteende. Attrahenter och andra aktivatorer är evolutionsmässigt att betrakta som felslagna försvarssubstanser som leder de växtätare som lärt sig att tåla dessa ämnen till en exklusiv näringskälla. Förklaringen till att växten fortsätter att producera dessa ämnen är att de fortfarande ger skydd mot andra växtätare.

Även om insekterna synes ha fler möjligheter att anpassa

sig till växterna biokemiska krigföring än växterna har att undkomma växtätande insekter så måste framför allt den första kontakten insekt:växt vara avgörande för näringsvalet. Det som framför allt utvecklas hos insekterna bör vara de kemoreceptiva system som upptäcker växtkemikalierna, kodar informationen och dechiffrerar koden i centrala nervsystemet. Sådana förändringar är ju en förutsättning för beteendeförändringar hos insekten.

Mångfalden av näringsrelationer mellan insekter och växter är enligt detta resonemang en produkt av samevolution, som skett i två av varandra oberoende muterande system, påverkande växternas syntes av sekundära växtsubstanser och insekternas identifieringssystem för dessa substanser (22).

De senaste årens forskningar inom området växtätare:växtrelationer (23-33) har lett till att man nu börjar urskilja ett mönster i fördelningen av de sekundära växtsubstanserna.

Enligt en hypotes av Feeny (34,35) har växternas varierande "upptäckbarhet" (plant apparency) för växtätare lett till att en typ av kemiskt försvar utvecklats hos "svårupptäckta växter" (unapparent plants) en annan hos "lättupptäckta växter" (apparent plants). Rhoades och Cates (36) har formulerat en allmän teori om antiherbivorkemi som leder till en liknande tolkning av den allelokemiska variationen hos växterna.

1.1 Svårupptäckta växters försvar, ett kvalitativt försvar med toxiner och beteendedeterrenter

Ur växtätarnas synpunkt "svårupptäckta" växter bygger upp de örtartade samhällena i "ung natur" d v s tidigare successionsstadier i landekosystemens utveckling. Ett hårt selektionstryck ställer här stora krav på snabb tillväxt och framgång i konkurrensen om mineralnäring, vatten och ljus samt hög produktion av avkomma som en anpassning för

effektiv spridning och kolonisation av nya områden. Sådana växter har inte råd med stora ämnesomsättningskostnader för det kemiska försvaret. Selektionen främjar substanser som toxiner och beteendedeterrenter vilka är verksamma i små mängder. Substanser som inte innehåller begränsande ämnen gynnas. Alkaloider är t ex mer "dyrbara" på kvävefattig jord än terpener. Mycket litet är känt om det kvantitativa innehållet av sekundära växtsubstanser och dess variation i olika delar av växten samt beroendet av ålder och miljöbetingelser.

Den totala halten av sekundära växtsubstanser i örtartade växters bladmassa tycks dock i regel vara mindre än 2 % av färskvikten. Andelen substanser vilka är potentionellt toxiska för växtätarna är inte känd. Ett bra toxin ur växtens synpunkt bör vara "billigt" att producera, högaktivt i låg koncentration mot fysiologiska system i djur men ej i växter samt ha fysikaliska egenskaper så att det lätt tränger in i målvävnaderna. Väl inne där bör det vara resistent mot nedbrytning och detoxifiering. Doseringen av försvarssubstanserna efter tid och plats bestäms av anpassningsvärdet. Halten är som regel högre i unga blad.

Alla växter inom en kemiskt likartad familj befinner sig i konkurrens om minskad andel av växtätarbördan. Ett sätt att undkomma ett ökat ättryck från anpassade växtätare är att producera nya substanser. Kemisk originalitet främjas. En ökning av koncentrationen kostar som regel för mycket och kan dessutom verka attraherande på de växtätare som redan är specialiserade på växten ifråga. Andra sätt att undgå växtätarna är minskad upptäckbarhet genom habitatförskjutning, ändrad bladform eller förlust av attrahentsubstanser.

Växterna är utsatta för en ständig motadaption från växtätarnas sida, vilken bl a medför risk för kolonisation av nya arter. De växtätare, som redan är anpassade för en likartad produktion av sekundära växtsubstanser gynnas.

Ex. bergrovfjärilen (Pieris ergane) tycks ha isolerats och bildat en egen art skild från moderarten, rapsfjäril (P. napi) genom att den fått förmåga att känna igen och acceptera glycosinolatinnehållet i en ny korsblommig värdväxt, stenkrasse (24). Sannolikheten för en sådan mutation är större hos en art som redan är anpassad till andra glycosinolatväxter.

Svårupptäckbara växter skyddas också genom s k associationell resistens, d v s sidoeffekter från kemiska försvarssubstanser hos andra växtarter. Tahvanainen & Root (25) har t ex visat att kemiska stimuli från Lycopersicum esculentum (tomat) och Ambrosia artemisifolia gör det svårare för kåljordloppa (Phyllotreta cruciferae) att hitta de korsblommiga värdväxterna.

Den kemiska mångformigheten som är karakteristisk för "ung natur" ändras ständigt på grund av skiftningar i selektionstrycket från växtätande djur, svampar och mikroorganismer.

1.2 Lättupptäckta växters försvar, ett kvantitativt försvar med substanser som gör näringen svårtillgänglig

Den vanlig eken (Quercus robur) kan nämnas som exempel på denna typ av växter, karakteristiska för sena successionsstadier, s k klimaxvegetation. Lättupptäckbarheten förklarar sannolikt det stora antal insektsarter som har koloniserat denna växt. Det kemiska försvaret utgörs av höga halter av spjälkningsnedsättande substanser, tanniner, vilka verkar genom komplexbindning till proteinernas peptidbindningar och möjligen också genom inhiberande verkan på de enzym som spjälkar proteinerna. De lättupptäckbara växterna försvarar sig också genom selektiv eliminering av substanser, nödvändiga för växtätarna men inte för växten. Mogna ekblad har låg kväve- och vattenhalt. Ett ökat "ättryck" resulterar hos denna typ av växter i en ökad halt av försvarssubstanser. Även de insekter som anpassat sig till att leva på lättupptäckbara växter påverkas negativt av det kemiska försvaret. Detta visar sig bl a i en lång-

sam tillväxttakt jämfört med närstående arter som lever på svårupptäckta växter. Selektionen främjar bibehållande av de kvantitativa försvarssubstanserna oavsett om de också förekommer hos andra arter. Detta innebär att kemisk parallellism är vanlig när det gäller denna typ av kemiskt försvar.

Graden av upptäckbarhet varierar inom en och samma växt. Unga ekblad är svårupptäckta genom varierande utspricknings tid och kort utvecklingstid (3 veckor). De har också visat sig sakna ett kvantitativt försvar. Selektionen bör istället ha lett till utveckling av ett kvalitativt försvar med toxiner och beteendedeterrenter. Ett sådant är ännu inte påvisat i ek men däremot i unga blad av örnbräken.

Specifika inhibitorer av proteinspjälkande enzym förekommer i både lätt- och svårupptäckta växter. De utgör vanligen mindre än 2 % av vävnadsinnehållet och anses verka genom påverkan av enzymmolekylernas aktiva ytor eller allostrera centra.

1.3 Diskussion av hypotesen om växternas "upptäckbarhet"

Feeny har studerat ett stort antal insekt-växt relationer bl a hos korsblommiga växter och ek. Insikten om de principiella skillnaderna i det kemiska försvaret hos dessa växter väcktes av frostfjärilslarvernas dramatiska skifte från ekbladsätande till annan växtdiet i mitten av juni. Detta konstaterades bero på utbildningen av det ovan beskrivna kvantitativa försvaret med bl a garvämnen (39). Sambandet mellan växternas upptäckbarhet och utformningen av det kemiska försvaret stöds av en rad empiriska fakta. Örtartade växter i tidiga stadier av successionen kännetecknas av en hög kemisk variabilitet. Dessa ämnen är verksamma i ringa koncentrationer och fungerar dessutom i många fall som aktivatorer för de specialister bland

växtätarna som anpassat sig för de allelokemikalier som kännetecknar en viss växtgrupp. Generalister bland växtätarna äter ett bredare spektrum av näringsmässigt acceptabla växter förutsatt att de innehåller verksamma repellenter.

Kreosotbuskar (Larrea tridentata och L. cuneifolia) i amerikansk ökenvegetation har unga blad med ett kvantitativt försvar bestående av lipofila monomera fenoler, vilka liksom tanninerna gör proteinerna i bladen svårtillgängliga (40). Den omvända försvarsfördelningen jämfört med ek förklaras av att de unga bladen som ständigt spricker ut i skottspetsarna på dessa växter är den lättupptäckta delen av växten. Fördelningen av försvarssubstanser så långt den är känd stämmer väl med "upptäckbarhetshypotesen". Andra moment, t ex tesen att försvarssubstanserna medför dryga ämnesomsättningskostnader för växterna, är svårare att bevisa. Över huvud taget måste hypotesen givetvis testas vidare på en rad växt-växtätarrelationer. Vi är dock övertygade om att den utgör en betydelsefull milstolpe på vägen bort från en huvudsakligen deskriptiv växtkemi. Hypotesen bäddar också för i fält testbara följdhypoteser. Den utgör en grund för en samevolutionsdiskussion i termer som individuell upptäckbarhet, generationsupptäckbarhet och populationsupptäckbarhet som bör kunna öka förståelsen av de ekologiska sammanhangen.

2. ORSAKER TILL KULTURVÄXTERNAS MOTTAGLIGHET FÖR SKADEGÖRARE I MODERNT JORDBRUK

De flesta kulturväxter är örtartade och hör ursprungligen hemma i tidigare stadier av vegetationssuccessionen. I naturligt tillstånd är de svårupptäckta och deras kemiska försvar är anpassat efter dessa förhållanden. Det moderna jordbruket har gjort dem lättupptäckta genom odling i monokulturer (28) samtidigt som en långt driven växtförädling har inneburit en sänkning av totalhalten och variationsrikedomen av sekundära växtsubstanser.

Även om de kvantitativa undersökningarna av växternas allelokemikalier är fåtaliga är det inga svårigheter att hitta exempel på att förädlingen gått ut över den kemiska variationsrikedomen hos de olika sorterna. Inga vilda cruciferer har konstaterats sakna förmåga att syntetisera glykosinolater (41) men vissa kålsorter är numera sinigrinfria. Förädlingen har delvis dikterats av nationella smakvanor. Med ökad levnadsstandard förskjuts smaken från glykosinolatmustig vitkål och grönkål till mildare sorter som blomkål och brysselkål (42). Samma tendens gäller förädlingen av gurkväxter (cucurbitaciner) och Solanum-arter (alkaloider) (21).

Följden har blivit en oacceptabelt hög angreppsfrekvens från växtätarnas sida. Hittillsvarande åtgärder har huvudsakligen bestått i tidvis tillförsel av höga halter av artificiella kemikalier. Mot denna bakgrund synes det angeläget att på ett antal pilotarter bland skadegörarna systematiskt pröva möjligheterna att använda växternas eget kemiska försvar, de sekundära växtsubstanserna.

3. ALTERNATIVA KONTROLLMETODER GRUNDADE PÅ VÄXTERNAS EGNA KEMISKA FÖRSVAR

Det gäller alltså att återge våra kulturväxter det naturliga försvar som vi berövat dem, bestående av:

- kemisk mångfald, helst bestående av flera olika kemiska försvarslinjer, som försvårar växtätarnas motanpassning
- kemisk originalitet jämfört med andra samväxande arter
- förmåga till snabb utveckling, dvs förändring av det kemiska försvaret
- associationell resistens, dvs åtnjutande av sido-effekter från andra växters försvarssubstanser
- näringsmässig obalans ur växtätarens synpunkt

Växtens kemiska självförsvar mot växtätare har också en rumslig aspekt. Det utgöres av en tredubbel försvarsmur bestående av de dofter som avges från växten, ett ytskikt av smaksubstanser och de ämnen som frigörs när växten skadas.

Praktiskt yttrar sig det kemiska försvaret som olika former av resistens som kan beskrivas med funktionella och genetiska termer (18,43,44).

3.1 Identifiering och utnyttjande av försvarssubstanser hos växter, som framgångsrikt motstått angreppen från våra kulturväxtskadegörare

Inventering av det kemiska försvaret hos ett antal "icke värdväxter" för en skadegörare. Genom att applicera ett antal av dessa på värdväxten återställs den naturliga kemiska variationsrikedomen. Metoden kan utformas som en flerstegskontroll genom att med olika repressorer påverka olika delbeteenden i honornas äggläggning och larvernas ätande. Fördelar: Låga tröskelvärden och nedbrytbarhet. Nackdelar: Många naturliga försvarslinjer är också toxiska.

Det största antalet arbeten inom detta område gäller den kemiska styrningen av insekternas ätbeteende. 1974 publicerade Chapman (45) en översiktsartikel som upptar 163 referenser. Hedins et. al. arbete (46) från samma år med titeln "Insect plant attractants, feeding stimulants, repellents, deterrents, and other related factors affecting insect behaviour" innehåller 200 referenser, av vilka ett stort antal bara är orienterade undersökningar. När detta antal ställs mot antalet beskrivna växtätande insektsarter, vilket av författaren låt skattas till 350.000, framgår det tydligt hur litet vi vet om de grundläggande kemiska faktorer som kontrollerar de insekt-växtrelationer, som är av så stor betydelse för människans försörjninsmöjligheter. Ur praktisk synpunkt är givetvis äggläggningsavskräckande allelokemikalier av speciellt intresse därför att de griper in innan angreppet sker. Hedins arbete upptar här en enda referens (47).

3.2 Utarbetande av odlingsmetoder som ger mindre lättupptäckbarhet

Root (31) präglade termen "associationell resistens" (associational resistence) för den minskning av angreppen som kommer en viss växtart till del i blandbestånd (38). Undersökningar av försvaret mot växtätare har helt naturligt huvudsakligen inriktats på de drabbade arterna. I ett arbete med titeln "växtförsvarsgillen" ger Atsatt et. al. (8) en rad exempel på att de enskilda växtarternas försvar kompletteras med ett samförsvar. Parasitflugor och parasitsteklar angriper en större andel av fjärilslarverna på ett kålfält om goda nektarkällor i form av blommande umbelliferer finns i närheten. Vitklöver (Trifolium repens) klarar sig bra mot harangrepp tillsammans med blåsklöver (T. fragiferum) men inte i rena bestånd. Toxiska växter som innehåller äggläggningsstimulanterna för en viss art, fungerar som bulvanplantor för en viss art, t ex nattskatta (Solanum nigrum) för coloradoskalbaggen (Leptinotarsa

septemlineata).

Dessa exempel leder till samma slutsats om "upptäckbarhetshypotesen", nämligen att heterogenitet inom och mellan populationer är en viktig försvarsfaktor som bl a verkar konserverande på resistensgener.

En kartläggning av olika kulturväxters kemiska försvarslinjer bör således ske. Med utgångspunkt från denna kan ekonomiskt försvarbara blandkulturer utexperimenteras, vilka ger optimal svårupptäckbarhet och hög associationell resistens.

Insikten om att mångfald är en viktig ekologisk princip även i jordbruksekosystemet börjar åter vakna (48).

3.3 Framställning av resistenta sorter, grundad på identifiering av den kemiska variation som bygger upp resistensen

Utvecklingen av högavkastande kulturväxter har samtidigt inneburit en negativ selektion i fråga om de sekundära växtsubstanser som ingår i växternas naturliga försvar mot växtätare. Detta återspeglas i att flera skadegörare, t ex kålfjäril, i valförsök "föredrar" kulturväxterna framför de vilda värdväxterna.

Växtförädling med sikte på resistenta sorter innebär ofta en selektion som åter höjer och differentierar produktionen av sekundära växtsubstanser. Kemisk identifiering av de aktiva substanserna skulle kunna ge växtförädlaren möjligheter att utvärdera den genetiska variationen och därmed oanade möjligheter att framställa sorter med effektiv genetisk resistens mot skadegörare (se vidare 12.1).

Maxwell (49) påpekar att det är anmärkningsvärt att växtförädlarna kunnat frambringa resistenta sorter utan att

känna till de kemiska faktorer som bygger upp resistensen. I sin bok "Växtförädling - grön evolution" (50) framhåller Hagberg (Sveriges Utsädesförening i Svalöv, landets officiella växtförädlingsinstitut) vikten av att växtförädlarna har tillgång till laboratorier med kompetens inom växternas försvarskemi.

4 KÅLFJÄRIL (PIERIS BRASSICAE) - ETT LÄMPLIGT PILOTOBJEKT

Kålfjärilen och de två andra kålskadegörarna Pieris-arterna raps- och rovfjäril, tillhör i vårt land inte de ekonomiskt stora skadegörarna. Trots användning av en rad biocider uppskattade 110 yrkesodlare, som besvarade en brevenkät, sänd till 848 odlare i Sverige (1972), det genomsnittliga skördebortfallet till ca 15 %. Skadorna är mycket varierande. En odlare skrev att kålplantorna efter en svår attack såg ut som "palmer", bara de stora bladnerverna var kvar av bladen.

Dessa fjärilar orsakar betydande skador hos odlare, som av ekonomiska eller principiella skäl avstår från en effektiv giftbekämpning av de tidiga larvstadierna.

Omkring 1860 rapporteras rovfjäril (the imported cabbage worm) för första gången från Canada. Redan 1870 orsakade den betydande skador i stora delar av USA. Rovfjärilen är nu den mest betydande kålskadegöraren i dessa länder (51). Enligt Gardiner (52), som 1972 mottog kålfjärilar från Chile för artbestämning, sprider sig nu Pieris brassicae snabbt i Sydamerika och orsakar allt större skador. Alla tre fjärilarna har en cirkumpolär utbredning.

Den initiala informationsmängd som står till förfogande beträffande kålfjärilarna och deras värdväxter gör dem speciellt lämpade för en pilotundersökning av hur naturliga växtsubstanser med repellent- och deterrentverkan skall kunna användas för kontroll av skadegörare. Denna bedömning stöds ytterligare av att flera utländska forskargrupper (bl a i Wageningen, Holland, samt Cambridge och Oxford, England) är intensivt sysselsatta med att ytterligare utreda kålfjärilarnas biologi. Till detta kommer att utarbetade odlingsmetoder ger tillgång till försöksdjur året runt.

4.1 Kålfjärilarnas äggläggning

Vid ett utnyttjande av sekundära växtsubstanser med repellent- och deterrentverkan för att skydda de odlade värdväxterna kommer dessa substanser att verka i konkurrens med värdväxtens naturliga attrahenter och stimulanter. Det är därför speciellt viktigt att kålfjärilarnas äggläggningsbeteende samt larvernas ätbeteende är väl undersökta och de beteendeutlösande växtsubstansernas kemiska struktur känd.

En äggläggande kålfjärilshona attraheras till gröna ytor. Doften av de i värdväxterna ingående senapsoljeglykosiderna fungerar som arrestanter som stoppar upp honans sökflykt över områden med värdväxtplantor. Honan slår ned på diverse växter. Rätt värdväxt utväljs med hjälp av kontaktkemoreceptorer på tarserna. Specialiserade receptorceller för senapsoljeglykosider har identifierats i en speciell typ av sensiller, som förekommer talrikare på honans tarser än på hanens. Själva äggläggningen utlöses också av senapsoljeglykosider via dessa kemoreceptorer på tarserna (53a).

4.2 Larvernas näringsval

Larvernas val av föda sker i tre steg (53b):

1 Ett första urval sker med luktsinnet. Vardera antennen har 16 luktceller. I spetsen av maxillarpalperna finns 3 luktsensiller. Luktcellerna tillhör den typ som brukar kallas generalister med delvis överlappande reaktionsspektra. En viss växtdoft orsakar alltså ett typiskt reaktionsmönster genom att öka impulsfrekvensen hos vissa celler och minska den hos andra.

2 Bitande utlöses via smaksinnet. Vardera maxillen bär 2 st sensiller innehållande vardera fyra smakceller. Den mediala sensillen innehåller två saltceller, en cell känslig för senapsoljeglykosider samt en deterrentcell. Den laterala sensillen innehåller en amino-

syrecell, en sackaros/glykoscell, en anthocyancell samt en cell svarande på lösningar av senapsoljeglykosider. Den viktigaste bitstimulanten är sackaros förstärkt med senapsoljeglykosider och aminosyror. Deterrentcellen reagerar på ett brett spektrum av sekundära växtsubstanser.

Sväljande utlöses via smakceller i munhålan. Ett par sensiller i munhålans tak har konstaterats innehålla en salt-, en sackaros- och en deterrentcell.

5 UTARBETANDE AV TEKNIK FÖR ODLING AV FÖRSÖKSDJUR ÅRET RUNT

Ett rationellt utnyttjande av tillgängliga resurser förutsätter tillgång till försöksdjur under hela året. Vid beteendetesten är det dessutom många gånger nödvändigt att ha kännedom om djurens ålder och tidigare erfarenhet. Utformningen av insektariet vid Avdelningen för Biokemisk Ekologi i Mölndal samt den teknik som används vid odling av de tre kålskadegörande Pieris-arterna har tidigare beskrivits (54). Odlingar av denna typ är mycket tidskrävande, vilket omvittnas från flera håll (55). Otillräcklig tillsyn avslöjar sig vid odling av kålfjärilar omedelbart i uppflammande sjukdomsangrepp bl a orsakade av ett latent granulosisvirus (56), som överförs via ovarierna. Tidigare har som foder använts vinterhärdig grönkål och fodermärgkål från egna odlingar. Den sjunkande foderkvalitén under vintern återspeglade sig tyvärr i en ökad sjukdomsfrekvens bland larverna.

Artificiella näringssubstrat för kålfjärilslarver har tidigare utvecklats av David och Gardiner (57,58) baserade på andra forskares experiment med växtätande fjärilslarver bland vilka Bottger (59), Beckman et. al. (60), Vanderzant et. al (61,62) och Ignoffo (63) kan nämnas. Ma (52) använde ett halvsyntetiskt medium modifierat efter Riddiford (64).

Vårt arbete består inte i noggranna kvantitativa studier av odlingsbetingelserna. Målsättningen har varit att åstadkomma en arbetsbesparande odlingsteknik i första hand med sikte på vårt nuvarande huvudobjekt kålfjäril (Pieris brassicae), i andra hand har hänsyn tagits till resultatens tillämpbarhet på andra insekter.

Först prövades en halvsyntetisk diet enligt David och Gardiner. Inledande svårigheter med att etablera larverna på fodret visade sig bero på ett giftigt cellulosapulver

(preparerat för kromatografi). Enligt David och Gardiner är den halvsyntetiska dieten med 1,4 % pulvriserade torkade kålblad användbar för att vidmakthålla en kultur av kålfjärilar. Detta verifieras av Junnikkala (65) som använde en diet beredd efter detta recept. David och Gardiners resultat visar att denna diet är underlägsen kål ifråga om smaklighet för larverna. Bara en tredjedel av de larver som ätit kål accepterade kålpulverfodret.

Ma (53) använde en halvsyntetisk diet modifierad efter Riddiford (64). Han fann att kåluppfödda kålfjärilslarver som överfördes till dieten knappast åt något under den första dagen efter överförandet. Under den tredje dagen och de närmast följande anpassade sig 45 % av larverna, något senare ytterligare 25 % men de återstående 30 % av larverna dog av svält. David och Gardiner (66) uppger att 50 % av nykläckta och icke utfordrade larver accepterar deras diet utan tillsats av vare sig kålpulver eller syntetiska glykosinolater.

Mas resultat indikerar att larverna etableras något lättare på hans diet, vilken likaledes inte innehåller vare sig kål eller sinigrin. Vi har använt David och Gardiners ursprungsrecept vilket modifierats genom tillsats av alfatocoferol, inositol och sorbinsyra, vilka är de extra tillsatserna i Mas diet. Glycin och cystine tillsattes dessutom eftersom Vanderzant uppger att kasein, som ju är huvudproteinkällan i fodret, är fattigt på dessa aminosyror. Vi eftersträvar ju en effektiv produktion av fjärilar för våra försök. De citerade resultaten visar att en kåltillsats i fodret är motiverad.

Beredandet av kålpulver är arbetskrävande. Bladen torkas för att undvika infektioner i dieten, ett annat skäl är att kålpulvret kan prepareras i förväg för vinterbehovet. Vitkål är nu numera tillgänglig under hela året. Larverna äter

gärna vitkål men dör efter en tid, enligt våra erfarenheter oftast av bakteriesjukdomar. Orsakerna till att de icke gröna bladen i kålhuvudet är otillfredsställande som foder är inte utredda. En föreslagen förklaring är den låga askorbinsyrehalten i dessa blad (67). Trots dessa erfarenheter visade sig en tillsats av 10 % mixermald vitkål till det halvsyntetiska fodret ge ett utmärkt odlingsmedium som nu med framgång använts för uppfödning av larverna under fyra år.

Vitkålsbladen blancheras några minuter i vattenånga innan de mals. Vitkålsmixen kan förvaras djupfryst i portionsförpackningar.

Det har visat sig nödvändigt att noga kontrollera vitkålens ursprung. En biocidolycka orsakad av besprutad vitkål raderade för en tid sedan nästan helt ut våra kålfjärilsodlingar och har orsakat stort avbräck i våra beteendetester.

Halvsyntetiskt foder för Pieris brassicae, P. rapae och P. napi:
En halvsyntetisk diet har utformats med utgångspunkt från den diet som använts av David och Gardiner (1965). Genom tillsats av färsk kål, finmalt i mixer, (ca 100 g/lit) erhålls ett utmärkt odlingsutfall, bättre än på naturligt foder av god kvalitet. Larverna äter inte den "gröt" som erhålles vid upptining av djupfryst kål. Kålmixen såväl som det färdiga fodret kan däremot utan olägenhet djupfrysas.

Anvisningar för beredning av ett halvartificiellt foder för Pieris brassicae L., Pieris rapae L, och Pieris napi L:

Receptet ger 1 liter foder.

Agar:

1 agar 25 g
2 dest.vatten 525 cm^3

Blanda agar och vatten. Värm under omrörning (autoklavering är ej nödvändig). Häll agarn i mixerskålen medan omröraren arbetar när temperaturen sjunkit under 80° C.

Fasta ingredienser:

1 kasein 32 g
2 vetegroddar 28 g (finmales i mixer)
3 Wessons saltblandning 9,5 g
4 socker (sackaros) 32 g
5 cellulosa 5 g
6 cystin 1 g
7 glycin 1,5 g
8 inositol 0,3 g
9 sorbinsyra 2 g

Väg upp satser av de fasta ingredienserna i engångsburkar med lock.

Kålmix:

1 290 cm^3 kåljuice

Ca 100 g vitkål mals med 100 cm^3 dest.vatten till en homogen "juice" i mixer.
Späd till 290 cm^3. Satser av kålmixen kan förvaras djupfrysta.

Vätskor:

1 kolinklorid (10 % vattenlösn.) 9,5 cm^3
2 metyl-p-benzoat (15 % lösn. i 95 % alk.) 9,5 cm^3
3 linfröolja 5 cm^3
4 formalin (10 % vattenlösn.) 4 cm^3
5 kaliumhydroxid (4M) 4,5 cm^3

Vätskorna mäts upp satsvis i graderade engångsbägare. Förrådsflaskorna förvaras i kylskåp.

Vitamin-antibiotikabland.: 5 g

Blandningsanvisningar:

1 Häll de fasta ingredienserna i mixerskålen
2 Starta maskinen 1 - 2 - 3. (Använd degkrokarna)
3 Tillsätt kålmixen. Låt maskinen arbeta till dess "smeten" blir jämn. Låt en sked glida efter den roterande skålens vägg medan maskinen går, så att de fasta ingredienser som fastnat på väggen, blandas in i smeten
4 Tillsätt vätskorna
5 Tillsätt agarn (max 80° C)
6 Tillsätt vitamin-antibiotikablandningen
7 Stoppa maskinen
8 Häll upp blandningen i en varm doseringskanna
9 Gjut fodret i engångsbägare
10 Sätt inte på locket förrän fodret svalnat för att undvika kondens.
Fodret kan förvaras djupfryst i månader.

Separata beskrivningar för framställning av i ovanstående recept ingående saltblandning respektive vitamin-antibiotikablandning:

Wessons saltblandning

mangan (II) sulfat-1-hydrat $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2 g
dikaliumvätefosfat K_2HPO_4 130 g
zinkklorid $ZnCl_2$ 0,1 g (mortlas)
koppar (II) sulfat-5-hydrat $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,1 g (mortlas)
kalciumvätefosfat $CaHPO_4 \cdot 2\ H_2O$ 30 g
kalciumkarbonat $CaCO_3$ 120 g
magnesiumsulfat $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 41 g
natriumklorid Na Cl 67 g
järn (III) citrat $C_6H_5FeO_7 . 5\ H_2O$ 11 g (mortlas)
kaliumjodid KJ 0,30 g (mortlas)

Vitaminblandning:

nikotinsyra	0,5 g
kalciumpantotenat	0,5 g
riboflavin	0,25 g
tiamin (aneurinhydroklorid)	0,13 g
pyridoxinhydroklorid	0,13 g
folsyra	0,13 g
d-biotin	0,01 g
cyanocobalamin	0,001 g
	1,65 g

Vitamin-antibiotikablandning:

Vitaminblandning	1,65 g
Streptomycinsulfat	3,30 g
Aureomycin	29,70 g
Askorbinsyra	66 g
	100,65 g

Projektledaren har tidigare (54,68) arbetat med dagfjärilar av gruppen blåvingar (Lycaeniae). Blåvingarna är erkänt svårodlade (69) trots att det komplicerade myrberoendet visat sig vara icke obligat.

Vid vårt insektarium har vi framgångrikt odlat puktörneblåvinge (Polyommatus icarus Rott)på ovanstående artificiella foder med tillsats av blåluzermix (Medicago sativa).Resultatet antyder att dieten i denna utformning kan vara användbar för ett stort antal insektsarter. Grundreceptet har också modifierats (60) för uppfödning av larver av sädesbroddfly (Agrotis segetum, Schiff.) och åkerjordfly (Agrotis exclamationis, L.) samt för makaonfjäril (Papilio machaon, L.) (71).

Odlingsaskar av engångstyp

Rengöring och desinficering av använda plastaskar är ett

mycket tidsödande arbete trots användningen av pappershanddukar som insats för att underlätta rengöringen. Övergång har därför skett till odlingsaskar av engångstyp, (se Fig. 1). Det halvsyntetiska fodret gjuts i 50 cm^3 "medicinbägare" av glasklar plast med påtryckningslock. Antalet larver anpassas så att hela foderytan äts av kontinuerligt. Ca 50 nykläckta larver överförs till fodret. I de senare larvstadierna placeras 10 larver i asken. Locket perforeras med en preparernål för att motverka mögelbildning. Foderbägarna byts ut två gånger per vecka.

Pupporna förvaras i större engångsaskar (14x10x6 cm), som slängs sedan samtliga puppor kläckts. En oblekt pappershandduk används som insats för att underlätta för fjärilarna att klättra upp efter väggarna, vilket är nödvändigt för normal utveckling av vingarna.

KONSTRUKTION AV TVÅVALSKAMMARE FÖR BETEENDE-TEST AV VÄXTSUBSTANSER

De tre först utvecklade modellerna av tvåvalskammare har tidigare beskrivits (54). Modell IV (se Fig. 2) ger möjlighet till kvantitativa test. Doftgivarenheten utgörs av en isärtagbar metallcylinder med plats för 6 glaskapillärer. Glaskapillärerna fylls med doftextrakt. Doftavgivningen från kapillärerna, mätt som viktförlust per tidsenhet, är förvånandsvärt konstant. Kapillärerna vägs före och efter försöket. Luftströmmen ställs in med flödesmätare så att genomströmningen blir lika i båda hälfterna av kammaren. Vid ett flöde av 10 dm^3/min på vardera sidan kan någon spridning från "dofthalva" till "icke dofthalva" inte konstateras med hjälp av gaskromatografisk analys av Convalex-impregnerat glasfiberpapper, som placerats i de båda utloppsslangarna. Denna adsorptionsteknik för isolering och koncentrering av flyktiga ämnen beskrivs under punkt 8.

Modell V (Fig. 3) är en ytterligare förbättrad typ av tvåvalskammare, byggd helt i plexiglas och rostfritt ståltrådsnät. Den bullrande dammsugaren har här ersatts av en tystgående elektronikfläkt placerad i själva röret, som mynnar i ett annat rum. Fläkten suger luft genom apparaten. Luftströmmen kan varieras med hjälp av ett reglerbart spjäll på det 10 cm grova röret. Den ingående luften renas i ett filter av aktivt kol (Captair, molekylfilter C (Labora)) med ca 98 % filterverkan på gasformiga föreningar med en molekylvikt av 30 eller större. I doftgivarmodulen läggs önskat antal glaskapillärer på det rostfria nätet. Fjärilarna skadas mindre av fladder mot väggarna därför att testmodulen är cirkelrund. Denna kammare, som har tillverkats i dubbel upplaga, har nu helt ersatt de tidigare använda typerna.

Beteendedeterrenterna är i regel relativt små molekyler med förmåga att passera växtcellernas membraner.

I punkt 1 har redogjorts för den allmänna teori om samevolution mellan insekter och växter, som lett till att "avfallsproduktshypotesen" övergivits som förklaring till de sekundära växtsubstansernas existens. Likaledes har försöken att tillskriva vissa av dessa ämnen en roll som upplagsnäring, t ex alkaloider som kvävereserv och kolhydratdelen i glykosider som energireserv, inte visat sig hållbara (72).

En naturlig kontroll av skadegörare med växternas eget naturliga försvar ger möjlighet att ingripa i flera skeden av angreppet. Under punkt 3.1 har motiverats varför projektet för närvarande framför allt är inriktat på metoder att avskräcka från äggläggning. Selektionen bör ha främjat utvecklingen av sådana beteendedeterrenter bland de substanser som frigörs från växtens yta. Dessa substanser återspeglar givetvis produktionen av sekundära substanser i växten, som ju till en icke obetydlig del utgöres av toxiner, t ex senapsoljor (73) och cyanider (74), som upplagras i ofarlig form i växten i speciella strukturer.

Beteendedeterrenterna bör i aktiv form vara relativt små molekyler med förmåga att passera cellmembranerna. Molekylernas diffusionshastighet över membranerna är omvänt proportionell mot molekylstorlek och polaritet (75). Arbetet med isolering, identifiering och beteendetest bedrivs därför efter två linjer:

A Undersökning av spontant avgivna flyktiga substanser framför allt från unga växtdelar.

B Undersökning av de sekundära växtsubstanserna som frigörs när växten skadas.

7.1 Beteendetestens utformning

De odlingsmetoder som utexperimenterats har tidigare beskrivits under punkt 5. Vi har två stammar av kålfjäril (P. brassicae) i kultur, dels Cambridge-stammen, som hållits i kultur av Gardiner (Agricultural Research Council Unit of Insect Physiology) i över 20 år, dels en svensk vildstam som tillförs nytt avelsmaterial varje sommar. Cambridge-stammen visar ett lugnare, mer buranpassat allmänbeteende, som resulterar i en bättre parningsfrekvens. För övrigt har inte några skillnader i basbeteenden som ätande, parning och äggläggning kunnat konstateras mellan de båda stammarna. I mindre omfattning föds även vildstammar av rapsfjäril (P. napi) och rovfjäril (P. rapae) upp, men beteendetesten har i detta skede huvudsakligen inriktats på kålfjäril.

Kålfjärilshonorna parar sig vanligen på 3:e dagen efter kläckningen, men parningen kan ske tidigare och senare. Efter en parning läggs 300-400 ägg. Nästan alla ägg är fertila. Honorna kan para sig igen med ett intervall av 6-9 dagar. En hane kan para sig med åtminstone 4 honor. Äggen läggs under en fjortondagarsperiod med ett maximum efter 5-6 dagar. På en bra äggläggningsdag följer i regel en dålig.

Det vore önskvärt att genom individuell märkning av kopulerande honor kunna följa de enskilda honornas äggläggningscykel för att kunna plocka ut enhetliga och likformiga grupper för försöken med äggläggningsdeterrenter. Enligt Rotschild (personlig kommentar) är honorna inte så selektiva i sin äggläggning i början och slutet av äggläggningsperioden. Det tidskrävande odlingsarbetet medger med nuvarande bemanning av insektariet inte detta. En finspetsad skriftprojektorpenna (Staedtler Nylocolor) har visat sig användbar för märkning av fjärilarna, avsevärt bättre än de färger, klipp- och fjällskrapningsmetoder, som tidigare beskrivits.

Halten av sekundära växtsubstanser varierar i olika plantor beroende på genotyp och miljöbetingelser men även i olika blad beroende på ålder och exposition. "Försöksbladet" och "kontrollbladet" klipps därför ut ur samma vitkålsblad på var sin sida av mittnerven. Försökens vidare utformning framgår av nedanstående PM för en försöksvecka. Som framgår av de kemiska försöksresultaten, är antalet testvärda fraktioner stort.

PM för försök med äggläggande kålfjärilar i tvåvalskammare:

1 Använd bara de yttersta bladen av vitkålshuvuden

2 Klipp ut de två "testbladen" ur samma kålblad på var sin sida om mittnerven. Använd mallen. Yta ca 25 cm^2.

3 Placera bladen i likvärdig vinkel med undersidan nedåt

4 Applicera testlösningar på bladet med piprensare eller "bomullstoppar" utan antisepticum. Placera doftsubstansen på det rostfria nätet i doftgivaren vid försök med enbart doftverkan

5 Testtid: 2 x 3 tim (09.00 - 15.00)
Temp: Ca 280° C $\pm$ 1°.
Släck rampen efter 3 tim. Sätt in nya kålblad för nästa försök med samma honor.
Gör 4 försök/dag, dvs 2 försök/kammare

6 Veckoschema:
Fredagen "före": Överför 20 fräscha och bakkroppsstinna honor från odlingsburarna till en speciell bur för testdjur. Utrusta denna med honungsautomater men ej med kålblad.
Måndag: Märk 10 honor "1" Placera 10 i var-
Märk 10 honor "2" dera kammaren
Överför ytterligare 20 honor från odlingsburarna till testdjursburen efter försöken.
Tisdag: Märk 10 honor "3"
Märk 10 honor "4" 10 st/kammare
Överför honorna till testdjursburen efter försöken.

Onsdag: Gör försök med honor "1" och "2". Låt honor "3" och "4" vila i testdjursburen.
Torsdag: Honor "3" och 4" i försök, honor "1" och "2" vilar.
Fredag: Försök med "1" och "2", "3" och "4" vilar.
Ersätt döda honor med nya så att antalet honor i en försöksgrupp är 10 vid början av varje försök.
Återför de under veckan använda honorna till odlingsburarna.
Plocka ut nya honor till nästa vecka.
Fyll på med de fräschaste och bakkroppstinnaste honorna från den gångna veckan om det inte finns 40 nya honor med "dräktig" bakkropp.
Placera "engelska" och "svenska" honor i skilda försöksgrupper.
Använd även de ägg som läggs under försöken till odling.
Buren, där fjärilarna förvaras mellan försöken, skall dessutom innehålla 10 hanar, eftersom honorna, som tidigare påpekats, parar sig flera gånger.

7.2 Tomat (Solanum lycopersicum)

Doften av unga tomatskott nedsätter äggläggningen hos kålfjäril (54). Det gör även doften av supernatanten från ett bladhomogenisat. Unga tomatskott ("tjuvar"), som samlats med hjälp av yrkesodlare som odlar giftfritt, har djupfrysts i 100 g förpackningar. Dessa skott avger en intensivare doft än plantan för övrigt. Unga plantor ger det effektivaste skyddet enligt de odlarerfarenheter, som insamlats angående tomatplantans deterrentverkan på äggläggande kålfjärilar.

Efter upptining pressades saften ur tomatskotten med hjälp av en fruktsaftcentrifug (AEG). Saften doftade efter filtring fortfarande starkt. 6 st 10 ul kapillärer fylldes med

denna saft och placerades i doftgivarcylindern på ena sidan av tvåvalskammaren IV. Tio befruktade honor av Pieris brassicae placerades i kammaren. Doftsidan skiftades varje dag. Tab 3 visade att signifikant färre ägg lades på det kålblad som omgavs av tomatdoft.

Den uppnådda effekten 1:2 är för liten för praktisk kontroll. Detta bör dock ej avskräcka från fortsatt sökande efter aktiva doftsubstanser i tomat. Användbarheten kan vara en koncentrations- och appliceringsfråga. Även om doften ensam har effekt, kan man vänta att doft- plus kontaktkemoreception bör ha starkare verkan, bl a därför att kontakt-kemoreceptionen är nödvändig för utlösning av äggläggningen. Resultaten i tab 4 från försök där doft (från kapillärer i doftgivaren) testats mot doft + smak (från bladsaft applicerad direkt på bladet) visar att denna förmodan är riktig, inga ägg lades i dessa försök på det behandlade bladet.

Uppdelning i vattenlöslig fraktion och lipidfraktion:

Lipidfraktionen av den aktiva tomatsaften erhölls efter fördelning enligt Folch (76) samt efter extraktion med dietyleter och hexan. Den återstående vattenfraktionen testades i tvåvalskammaren. Tab 5 visar att doften av denna fraktion inte nedsätter äggläggningen.

I tab 6 redovisas resultaten av en rad försök med tomatbladsaft där paraffinolja, tricaprylin och diisodecylftalat använts som extraktionsmedel. Avsikten var, som diskuteras i punkt 7.8, att samtidigt testa dessa mediers effekt som kvarhållare för deterrenterna. Den kraftigt försvagade deterrentverkan jämfört med den obehandlade tomatbladsaften visar att huvuddelen av deterrentverkan tycks komma från vattenfasen, som har kontaktverkan. Detta antagande bekräftas av försök med den återstående vattenfasen efter pentanextraktion (tab 7) resp Folch-fördelning (tab 8).

Tab 9 visar att tomatbladsaftens deterrentverkan ej förstörs av djupfrysning.

Linalol, en av de identifierade komponenterna i tomatbladdoften, se under punkt 10.3, är av speciellt intresse därför att vi också återfunnit substansen i den deterrerande äggdoften (11.3). En försöksserie med 1 st 10 u l kapillär med linalol placerad i tvåvalskammarens doftgivare (tab 10) visar en viss deterrentverkan (1:1,6). Deterrentverkan vid direktapplicering av 1 % hexanlösning av linalol ger en betydligt starkare effekt, 1:4,2 (tab 11).

Vid en försöksserie med 1 % linalol placerades de båda kålbladen i de stora odlingsburarna. Sepahdex G-200 och diisodecylftalat prövades som doftkvarhållare. Kontrollbladet penslades med gelbildaren (G-200) respektive ftalatet. Försöksutfallet (tab 12) påverkas här dels av att linaloldoften sprids i hela odlingsburen, dels av deterrentverkan från äggen som verkar för en jämn fördelning av de många fjärilarnas fördelning av äggen på de båda kålbladen.

7.3 Gyllenlack (Cheiranthus cheirii)

Materialproblem och resultat av beteendetest:

De i gyllenlack förekommande deterrenterna har bedömts vara av speciellt intresse därför att de är starka nog att överflygla de i samma växt förekommande äggläggningsstimulanterna (glykosinolaterna).

Tvåvalskammarförsöken bekräftar (tab 13) att supernatanten från bladhomogenisat av gyllenlack har en mycket stark deterrentverkan på äggläggande kålfjäril. Försöken visar också att de aktiva komponenterna kan extraheras med polära lösningsmedel (tab 14).

Gyllenlack och den närstående arten sommarkårel (C. allionii) är tyvärr numera sällsynta i odling i vårt land därför att de är svåra att övervintra. Undersökningen av dessa växter försenades först på grund av brist på fräscht växtmaterial.

Den tidigare omtalade biocidolyckan i kålfjärilsodlingarna (punkt 5) har därefter ytterligare försenat beteendetesten med denna växt. En försöksserie med rapsfjäril (Pieri napi) (tab 15) visar dels att deterrentverkan på äggläggningen gäller även denna art, dels att även första årets blad innehåller de aktiva substanserna.

7.4 Timjan (Thymus vulgaris)

De inledande beteendetesten med trädgårdstimjan (Thymus vulgaris) och backtimjan (T. serpyllum) visade en svag deterrentverkan på äggläggande kålfjärilar, 1:1,7 (T.v.) och 1:1,5 (T.s) (tab 16). Sephadexgel tycka även i detta fall ha ringa effekt som doftkvarhållare. Vid försökens igångsättande doftade testbladet tydligt. Ingen doft kan förnimmas efter försökstidens slut.

Trots att timjan uppenbarligen inte tillhör de kraftigt verkande deterrentväxterna, valdes denna växt som objekt för den metodikundersökning (se under punkt 8) som var nödvändig för att kunna utforma optimala metoder för isolering och koncentrering av försvarssubstanserna. Detta arbete var en förutsättning både för de fortsatta beteendetesten och det kemiska analysarbetet. En litteraturundersökning, som kommer att publiceras i annat sammanhang, gav vid handen att timjan var den av de för undersökningen aktuella växtarterna som varit föremål för det mest omfattande intresset från kemisternas sida (66 referenser fr o m 1960). Det metoder som vi avsåg att utforma kunde således jämföras med ett rikt referensmaterial.

7.5 Lomme (Capsella Bursa-pastoris)

Genom valförsök sammanställde Terofal (77) en preferenslista för larvernas näringsval hos kålfjäril och rapsfjäril. Listan omfattar 50 växtsorter som alla innehåller ät- och äggläggningsstimulerande glykosinolater. Lomme (Capsella Bursa-pastoris) kommer bland de sista på denna lista. Endast starkt uthungrade larver avsmakar lommebladen, men äter inte vidare utan dör av svält. Dethier (68) erbjöd kålfjärilslarver en sandwich bestående av ett lommeblad dolt mellan två skivor av rapsblad. Kålfjärilslarverna vägrade efter avsmakning att äta anrättningen. En föreslagen förklaring är att lomme innehåller alkaloider, bl a bursin.

Den låga preferensen för denna växt gäller även kålfjärilarnas äggläggning. Inga ägg lades på lomme när lommeblad placerades på båda sidor i tvåvalskamrarna. I en annan försöksserie penslade vi testkålbladet med lommebladssaft. Resultatet (tab 17) är något svårtolkat utan ytterligare försök. Inga ägg lades i försök 521 och mycket få i försök 522, vilket beror på att de använda fjärilarna var gamla och slitna. Rothschild (personlig kommentar) uppger som redan nämnts att kålfjärilarnas val av näringsväxt är mindre exakt i början och slutet av äggläggningsperioden. Den ökade attraktiviteten hos det lommesaftpenslade kålbladet kan möjligen bero på att äggläggningsdeterrenterna i lomme snabbt bryts ned eller förflyktigas och att istället lommesaftens glykosinolatinnehåll förstärker testkålbladets egna kemiska äggläggningssignaler.

7.6 Fläder (Sambucus nigra)

Bladsaft från fläder (Sambucus nigra) har en stark deterrentverkan på rapsfjäril (Pieris napi) (tab 18). Doften från bladsaft (5x10 ul i mikrokapillärer i doftgivaren) verkar däremot attraherande. Huvudkomponenterna i doften från fläderbladsaften har visats vara benzaldehyd (Fig. 35). Denna substans används av biodlare som repellent vid skatt-

ning av kuporna. När 0,25 ml av en mättad vattenlösning penslades på testkålbladet kunde ingen doft förnimmas efter en halv timme. Ren substans injicerade på några ställen i bladet. Efter försökstidens slut (3 tim) doftade bladet starkt även när bara 2 ul injicerades. Detta bekräftades också med gaskromatografisk analys av doften från bladet.

Resultaten (tab 19) är inte entydiga, men studier av fjärilarnas beteende bekräftar tendensen till attrahentverkan. Fjärilarna slår genast ned och lägger ägg på ett blad som doftar starkt av injicerad benzaldehyd.

7.7 Andra potentionella deterrentväxter

De deterrentväxter som vi i detta skede intresserat oss för är som tidigare motiverats (3.1) äggläggningsdeterrentväxter. På grundval av en litteraturundersökning (54), den tidigare omtalade odlarenkäten (punkt 4) samt personliga kontakter med odlare har en lista sammanställts över växter med potentionell deterrent- och/eller repellentverkan på äggläggande kålfjärilar (tab 20). Det är sannolikt att de aktiva substanserna hos flera av dessa växter samtidigt påverkar larvernas ätbeteende på samma sätt som i det föregående visats för lomme (Capsella Bursa-pastoris).

Listan kan säkerligen utökas genom att systematiskt pröva effekten av växter som inte angrips av kålfjäril och i ringa utsträckning även av andra insektsarter. Denna metod har använts av Munakata el. al. (79) i jakten på växter som påverkar ätbeteendet hos "the tobacco cutworm" (Spodoptera litura).

7.8 Kvarhållare av flyktiga växtsubstanser

Ett stort problem vid test av flyktiga växtsubstansers effekt på kålfjärilar har varit den varierande flyktigheten hos dessa substanser. De mest lättflyktiga, dvs de med högt ångtryck, går helt i gasfas under tiden försöket på-

går och tar sålunda slut innan testet genomförts till fullo. Koncentrationen av varje enskild substans både i gas- och vätskeform blir varierande och eventuell effekt på fjärilarnas äggläggning blir svår att registrera. Att insekter reagerar olika för olika doftkoncentrationer kommer väl till uttryck hos honungsbiet (Apis mellifera), där en ändring i koncentrationen av de doftsubstanser bidrottningen utsöndrar inne i en bikupa innebär en ändring i arbetsbinas beteende gentemot drottningen (80). Därför måste testet göras under så välkontrollerade former som möjligt. Dravnieks (81) har diskuterat den instrumentella aspekten av detta när det gäller det mänskliga luktsinnet och anger olika sätt att erhålla mätbara koncentrationer av flyktiga substanser i luft, bl a genom utspädning av doft i lösningsmedel, direkt förgasning samt diffusion. Denna frågeställning har också varit känd inom parfymkemin sedan urminnes tider, då det här gäller att få en välluktande doft, t ex mysk, att dröja kvar så länge som möjligt vid påstrykning på mänsklig hud eller klädesdräkt. Här har man tillfört någon form av lösningsmedel, såsom doftkvarhållare med villkor att kvarhållaren icke påverkar doften i negativ riktning. Amylftalat, bensoesyra, bensylbensoat, cyklohexanoloxalat, dietylglykol, dietylftalat, etylbensoat, resorsinol diacetat, trikresylfosfat, trietylenglykol, trifenylfosfat, paraffinolja, propylenglykol, dvs högkokande vätskor har sålunda använts av människan såsom luktlösa eller svagt luktande kvarhållare (81,82).

Vad gäller insekter kan dessa högkokande vätskor till skillnad från människan vara beteendeframkallande antingen förstärkt med doftsubstansen (synergism) eller försvagad (intribition). Därför har förutom polyetylenglykoler och dess distearat, butyloleat, glycerolmonooleat,talg (83,84) även inerta bärarmaterial, såsom pappersfilter, cigarettfilter, tegelpulver, sand, glaskapillärer och plastmaterial, såsom polyvinylpyrrolidon, använts som doftkvarhållare vid

försök med insekter.

Inom projektet har testats följande såsom kvarhållare för enskilda substanser såväl som komplexa blandningar: Convalex (Leybold-Heraeus), pumpolja på glasfiberpapper, paraffinolja, trikaprylin, diisodecylftalat, Sephadex (Pharmacia).

En preliminär utvärdering ger vid handen att en specifik kvarhållare måste väljas för varje flyktig substans som skall testas, beroende på bl a lösligheten och ångtrycket hos doftsubstansen. Den levande växten i sig utgör naturligtvis den mest lämpade doftkvarhållaren och detta kan utnyttjas praktiskt genom att kålbladet (före äggläggningen) får stå och dra i en lösning av den eller de dofter som skall prövas och därefter insättas i testkammaren. Doftlösning kan även injiceras med spruta direkt i bladet, vilket har prövats bl a med benzaldehyd.

8 ISOLERING OCH KONCENTRERING AV ALLELOKEMIKALIER

Under de senaste tjugo åren har en intensiv forskning bedrivits vad beträffar flyktiga föreningar och dess struktur inom vitt skilda ämnesgrupper såsom t ex bilavgaser, tobaksrök, livsmedelsarom och insektsferomoner. Det stora problemet har i synnerhet inom feromonområdet varit att de flyktiga föreningarna föreligger i så låg koncentration att tillräckligt känsliga metoder ej finns tillgängliga för en direkt analys. Tillkomsten av gaskromatografi och masspektrometri har emellertid inneburit att separation och analys kan göras i nanogramskala. Dessa tekniska detektorer är dock vida underlägsna naturens egna och som jämförelse kan nämnas att ett mott (Plodia interpunctella) behöver endast 0,00004 - 0,00013 ng cis-9, trans-12, tetradecadienylacetat för att utlösa upphetsat sexuellt beteende hos 50 % av hanarna (87). Vidare kan visas att näsan hos Homo sapiens reagerar för 0,002 ppb av 2-metoxi-3-isobutylpyrazin i vattenlösning (88). Därför är det oundvikligt att införa någon form av koncentreringssteg för en tillfredsställande analys av denna typ av föreningar.

Metoder för isolering, koncentrering och separation av enskilda flyktiga föreningar måste väljas med yttersta noggrannhet och kritiskt utvärderas. Förluster eller artefakter som införes i dessa steg kan aldrig korrigeras i ett senare skede av analysen.

Detta avsnitt är ett försök att huvudsakligen med hjälp av litteraturuppgifter och egna undersökningar finna och utvärdera optimala metoder för isolering och koncentrering av växters försvarssubstanser. Tänkbara metoder kan indelas i följande huvudgrupper: Destillation, extraktion, direktanalys, utfrysning samt adsorption. Alltefter problemets art, kan man välja någon av de nämnda metoderna, antingen var och en för sig eller i kombination. Vid den kemiska analysen, som omedelbart följer på isolerings- och koncentreringsstegen, är för närvarande kombinationen

gaskromatografi - masspektrometri (GLC-MS) den mest betydelsefulla metodiken. Provet bör därför anrikas till en sådan koncentration att separation och identifiering kan genomföras med GLC-MS. Därför har speciell uppmärksamhet ägnats åt adsorption-desorptionsmetodiken, vilken lätt kan kopplas till GLC-MS.

8.1 Destillation

Denna metod är historisk och har mycket tidigt använts av parfymkemisterna för framställning av parfymer och eteriska oljor. Livsmedelskemisterna har även använt förfarandet för utvärdering av arom- och smakämnen i vår föda. Vid destillation behövs värme för överförande av prov i gasfas vilket kan leda till artefakter i form av omlagringar eller nedbrytning. Detta kan i viss mån undvikas om man använder måttlig värme i kombination med högvacuum. Tyvärr är det stor risk att förlora mycket lättflyktiga komponenter i samband med högvacuum, varför även i detta fall destillation bör användas med stor försiktighet. Representativa översiktsartiklar, där problemen i samband med destillation av lättflyktiga föreningar beskrivs, har gjorts av Weurman 1969 (89) och Chang 1973 (90).

8.2 Extraktion

Denna metodik innebär att någon form av lösningsmedel måste införas. Detta lösningsmedel måste sedan avlägsnas i ett koncentrationssteg, t ex destillation och bör därför vara lättflyktigt, varvid risken är stor att man anrikar eventuella föroreningar. Valet av lösningsmedel är sålunda mycket kritiskt. Insektsferomoner, som oftast är av opolär natur, har i många fall extraherats med metylenklorid (91). Detta lösningsmedel har låg kokpunkt, kan renas effektivt och kan användas i stora volymer utan brandrisk. Emellertid kan efter en längre tids förvaring saltsyra uppträda i metylenklorid, varför syran måste elimineras med kaliumkarbonat. Om detta lösningsmedel måste användas vid arbete med syralabila substanser. Detta är exempel på

vissa svårigheter vid arbete med lösningsmedel. Weurman (89) har en lista på 35 olika lösningsmedel, som har använts för extraktion av aromämnen i olika slags föda, av vilken man drar slutsatsen att valet av lämpligt lösningsmedel helt beror på de typer av föreningar man önskar extrahera. En fullständig extraktion av alla komponenter i en blandning med ett enda lösningsmedel, som vanligen göres, är därför ej möjlig.

Vad beträffar flyktiga lösningsmedel har en lovande metod beskrivits av bl Vitzthum och medarbetare (92). De använder flytande CO_2 för extraktion av rostad cacao. Det har visat sig att CO_2 är relativt fri från kontaminanter och har stor lösningskapacitet i jämförelse med konventionella lösningsmedel. Förfarandet kräver dock en komplicerad apparatuppställning.

Svårflyktiga lösningsmedel har även använts för t ex extraktion av aromämnen i föda där Nelson och Hoff (93) använder sig av paraffinolja och motiverar sitt val genom oljans stabilitet, icke blandbarhet med vatten, låga pris samt effektivitet.

Ett problem vid val av tyngre lösningsmedel är att avlägsna detta vid en koncentrering av provet. Ytterligare extraktion eller destillation måste då tillgripas, vilket gör metoden sårbar.

8.3 Direktanalys

Om tillräcklig mängd av den produkt man önskar analysera finnes i ursprungsprovet är det onödigt att införa någon form av koncentrering, varför analys kan ske direkt efter isoleringssteget.

8.3.1 Headspace

I det fall "headspace"-betingelser föreligger, d v s en gasfas i jämvikt med en vätska eller en fast fas i ett

slutet system med väl kontrollerade variabler såsom t ex temperatur, volym och tryck, kan direkt analys ske genom att en viss del av gasfasen injiceras i GLC-apparaturen med hjälp av en gastät injektionsspruta. Headspacemetodiken har behandlats mycket utförligt av Hachenberg och Schmidt (94). En invändning är att headspacemetodiken är ett konstruerat onaturligt statiskt tillstånd som ger en felaktig bild av speciellt den kvantitativa sammansättningen av de flyktiga föreningarna i gasfas. Detta är helt skilt från den kvantitativa sammansättningen av flyktiga föreningar som en levande organism kontinuerligt producerar. Även om headspacemetodiken är mycket välkontrollerad experimentellt bör den kompletteras med andra metoder för att få en riktigare kvantitativ analys av ett prov in vivo.

8.3.2 Andra metoder för direktanalys av biologiskt material

Olika typer av påsar har använts för insamling av flyktiga föreningar i luft för en direktanalys via gastät spruta (95,96). Injektionssystem har även konstruerats, vilket medger ett direkt införande av biologiskt material, såsom t ex insektskörtlar (97) och växtdelar (98). I samtliga fall har man problem med den ständigt närvarande vattenångan. Vid 20° C är vattenångtrycket 17,5 torr, vilket motsvarar 18,5 mg vatten per liter luft (98). Injektion av vatten i en gaskromatograf kan ge upphov till en oformlig topp, som i sin tur kan maskera eventuella andra toppar (99). Dessutom medför introduktion av vatten i masspektrometerns jonkälla försämrat vacuum med okontrollerade sekundära jonreaktioner som följd. Visserligen kan torkmedel såsom $MgSO_4$, Na_2SO_4, $CaCl_2$ o s v införas, men dessa har en förmåga att adsorbera andra föreningar än vatten (100, 101). Man kan även kondensera vattenånga, men även här kan andra föreningar kondensera tillsammans med vattnet (102).

8.4 Utfrysning (kondensering)

I de fall den nämnda direktmetodiken är otillräcklig och en koncentrering är nödvändig har utfrysning visat sig mycket användbar även i kombination med de andra metoderna. Generellt kan sägas om denna metod att den är synnerligen skonsam mot labila substanser. Förluster kan dock uppträda via inneslutning, adsorption, evaporering eller speciella egenskaper hos individuella komponenter i provet. Den största förlustkällan tycks vara evaporering beroende på att största möjligt kallyta måste vara i kontakt med provfasen för att bortförande av värme skall ske så effektivt som möjligt. För att öka ytan har man använt t ex glasull eller teflonkulor (103).

8.4.1 Separat utfrysning följd av extraktion eller adsorption

Största effektivitet tycks uppnås vid en total utfrysning av luft. Browne och medförfattare (104) använder sig av flytande kväve (-193°C) i kylfällorna och får på så sätt en nära nog total utfrysning av luft. Han anrikade mycket flyktiga feromoner från Ips pini samt I. confusus (bark beetles) för undersökning av dess biologiska aktivitet. Jämförande försök med torris - aceton i kylfällorna, vilket ger en högre kondenseringstemperatur, gav vid handen att vissa feromonkomponenter i små kvantiteter ej kondenserade vid den högre temperaturen.

Lueb och medarbetare (105) har gått vidare i denna utveckling och använder sig av flytande neon (-246°C) i kylfällor för provtagning av luft. Därvid kondenserade även gaser såsom H_2, CH_4, CO, CO_2 samt N_2O. I samtliga fall krävs en kombination med annan metodik, t ex adsorption eller extraktion för eliminering av det ständigt närvarande vattnet, vars störande egenskaper i den påföljande analysgången redan diskuterats.

8.4.2 Kylfälla omedelbart före separationssteget med GLC
En metodik som bör omnämnas är koncentration i kylfälla i omedelbar anslutning till separationssteget med gaskromatograf. Kondensering av provet göres då direkt på en nedkyld främre del av GLC-kolonnen, en förkolonn eller en kylfälla i kombination med GLC-kolonnen (se pkt 9). Exempel där kylning på kolonn använts är analys av cigarettrök (106,107). Förkolonn har använts för analys av flyktiga föreningar i apelsiner (108), blåbär (109) samt kylfälla i kombination med kapillär kolonn vid analys av föroreningar i luft (110).

8.4.3 Frystorkning
Frystorkning är en klassisk form av anrikning av prov i vattenlösning. Emellertid finns mycket få arbeten rapporterade med denna metodik utförd på naturliga blandningar av flyktiga föreningar i vattenfas bl a beroende på att dessa föreningar pumpas bort i samband med det låga tryck som metodiken kräver. Några arbeten visar en 5-faldig koncentrering och utbyten varierade från 90-100 % vid försök med modellsubstanser såsom t ex aceton och isopropanol (111, 112).

8.5 Adsorption
Denna metodik har använts under en lång tidsperiod och kan genomföras under synnerligen enkla betingelser. Metoden kräver ett medium, på vilket den organiska substansen absorberas, varefter ett desorptionssteg följer. Apparaturen kan göras mycket enkel och i korthet beskrivs den såsom ett rör, vanligen av glas, som fylls med adsorbenten. En gasfas innehållande organiska föreningar får passera genom röret, varvid adsorption av föreningarna sker. Härvid frigöres värme, vilket medför en minskning av adsorbentens adsorptionsförmåga till följd av förlängd tid för jämvikt mellan flyktig förening och adsorberad. Någon form av kylning under adsorptionssteget är därför nödvändig för att öka utbytet. Desorptionssteget är en omvänd process, i vilken energi måste tillföras. Detta kan ske i form av

värme eller en tryckreducering. Andra former för desorption kan vara extraktion eller förträngning. Adsorptionssteget kan göras kvantitativt för de flesta organiska föreningar. Svårigheten ligger i desorptionssteget, där artefakter kan införas. Vid värmetillförsel kan termolabila prov förstöras eller omlagras (89). Dessutom ställs krav på adsorbentens termostabilitet. Tryckreducering kan orsaka bortpumpning av mycket flyktiga substanser och extraktion innebär ju en utspädning av provet omedelbart följt av extraktionsmetodikens problem vid koncentrering. Förträngning är ett desorptionssteg som huvudsakligen har utförts på aktivt kol, dock i mindre omfattning, varför problemställningen vid denna metodik faller under punkt 8.5.1. Vidare kan det tidigare nämnda vattenproblemet i samband med provanrikning undvikas genom lämpligt val av adsorbent, d v s ett opolärt medium som har låg affinitet för vatten. Följande grupper av adsorptionsmedel har använts: aktivt kol, silikagel, aluminiumoxid, cellulosapulver, syntetiska fasta polymerer samt högkokande vätskor.

8.5.1 Aktivt kol

Detta adsorptionsmedel är klassiskt och redan i mitten på 40-talet beskrev Claesson dess egenskaper (113). En viss försiktighet har iakttagits med detta medel då det tidigt ansågs att aktivt kol kunde orsaka kemiska förändringar på de substanser som adsorberades samt att irreversibl bindning kunde äga rum. Detta har vederlagts under de senaste åren i och med en framgångsrik användning av grafitiserat "carbon black".

Aktivt kol kan framställas från många olika kolkällor och är ett icke selektivt adsorptionsmedel, som bibehåller sin aktivitet även i närvaro av vatten samt har en stor affinitet för alla organiska föreningar oberoende av deras struktur. Kolet har en stor yta, vilken kan ha vissa katalytiska centra, där kemiska förändringar av det adsorberade provet kan äga rum. Detta kan dock motverkas genom "förgiftning"

av de aktiva centra före adsorptionen. De förändringar som tidigare rapporterats för aktivt kol består t ex av oxidation av adsorberade aldehyder (114). Detta har sin förklaring i att syre adsorberats tillsammans med ett oxidationskänsligt prov, vilket i vissa fall kan undvikas genom arbete i en inert atmosfär, t ex N_2-gas. Andra artefakter har uppkommit genom upphettning av termolabila substanser i desorptionssteget (89), vilket kan undvikas genom användning av extraktionsmetodik. Här synes koldisulfid vara ett passande lösningsmedel, på grund av sin flyktighet, extraktionsförmåga (fördelningskoefficient) samt renhet (115).

Desorption av aktivt kol via förträngning beskrevs tidigt av Claesson (113) och har vidareutvecklats av bl Weurman (116). Processen innebär i korthet att en substans A som adsorberats ur en gasfas på aktivt kol kan helt undanträngas av en substans B, som tillföres i gasfasen. Ur en blandning kan man sålunda selektivt isolera de substanser man är intresserad av.

Aktivt kol kan ha olika strukturella former och den form, som för närvarande rönt störst intresse, är grafitstrukturen av "carbon black" (117). Detta kolslag har liksom vanligt aktivt kol mycket stark affinitet till de flesta luftburna organiska föreningar och kan kvantitativt avlägsna dessa ur luft. Dess kemiska stabilitet gör att reaktioner mellan adsorbent och prov är helt osannolika; dess termiska stabilitet är utmärkt, med följd att värmeadsorption är möjligt upp till 400° C, vilket kan krävas för mycket högkokande substanser; dess fysikaliska struktur är välkänd, dess yta är homogen och sist men inte minst affiniteten för vatten är mycket låg vid måttliga temperaturer. De arbeten som beskriver sistnämnda adsorptionsmedel använder sig huvudsakligen av värme vid desorptionssteget, varför försiktighet måste iakttagas vid arbete med termolabila substanser (118, 119).

8.5.2 Silikagel, magnesiumoxid, aluminiumoxid och cellulosapulver

Silikagel har i liten skala använts för adsorption av kolväten (120). Medlet deaktiveras lätt av vatten samt har förmåga att isomerisera t ex olefiner i desorptionssteget (121). En annan användning har också prövats i samband med bestämning av organiska föreningar ur luft, där föreningarna oxideras i syrgas efter desorptionssteget med åtföljande utvärdering av bildad koldioxid (122). Silikagel i kombination med magnesiumoxid (Florisil) har också prövats (123). Aluminiumoxid har använts vid en icke specifik bestämning av kolväten i bilavgaser (124). Vidare har cellulosapulver ingått som adsorptionsmedel vid isolering och koncentrering av insektsferomoner (125). Polariteten på nämnda medel gör att de lätt binder vatten tillsammans med polära flyktiga föreningar och är därmed begränsade i sitt användningsområde som adsorptionsmedel.

8.5.3 Högkokande vätskor

Under denna rubrik sammanfattas bl a pumpoljor, fett, stationära faser för GLC. Dessa adsorptionsmedel kräver någon form av bärare för att så stor adsorptionsyta som möjligt skall erhållas. Exempel på bärare är pulvriserat tegel, diamotära jordar, teflon, glas. Valet av dessa vätskor bestäms bl a av dess låga ångtryck samt dess kemiska och termiska stabilitet. Liknande krav ställs på bäraren för att desorptionssteget, som vanligen sker via värme och lågt tryck, ej skall bidraga till artefakter i analyssteget. I tabell 21 har en sammanställning gjorts över problemställningar där högkokande vätskor använts som adsorptionsmedel.

Stationära faser prövades redan i slutet på 50-talet av bl a Eggertsen och Nelsen (126a), vilka isolerade och analyserade lågmolekylära kolväten ur luft med dimetylsulfolan på tegelpulver. Cropper och Kaminsky (128) gjorde teoretiska beräkningar vid adsorption av toxiska organiska föreningar ur luft på 5 olika stationära faser med olika

polaritet. Silverstein och Rodin (134) studerade modellsubstanser av feromoner för adsorption på stationära faser och Tumlinson m fl (141) isolerade och analyserade sex attrahenter från bomullsvivel. I sistnämnda fall tillsattes antioxidanter för att förhindra eventuell oxidation av labila substanser. Janaks grupp (131,139,153) gjorde teoretiska beräkningar för adsorption av föreningar i luft på siloconelastomer (E301), polyetylenglykol samt silikonfett (Apiezon K) och gjorde praktiska försök. Dravnieks och medarbetare (135,136,143) gjorde liknande beräkningar på Apiezon och fann bl a att man kunde få ett reproducerbart gaskromatogram, en s k signatur, från varje komplex doftkälla. Maier och Kessler (166) har gjort en noggrann undersökning av lipider såsom adsorptionsmedel och finner att triglycerider, såsom tributyrin och triolein har stor kapacitet för aromämnen, speciellt vid temperaturer upptill 70° C. Detta bekräftar och styrker parfymkemisternas val av mycket ren talg och ister för anrikning av doftämnen ur blommor, den s k enfleuragemetoden, vilken använts även för adsorption av feromoner (144).

I och med de fasta polymerernas entré (punkt 8.5.4) bland adsorptionsmedlen i slutet av 60-talet började jämförelser göras mellan dessa och högkokande vätskor. Dravnieks (167) fann t ex att adsorption av organiska luftföreningar på fasta polymerer kunde göras snabbare än om vätskor användes på grund av diffusion in i materialet. Vätskefilmer kräver upp till 30 min för att mättas av en provsubstans. Dessa jämförelser gjorde att de mer lätthanterliga fasta polymererna föredrogs och undersökningar där högkokande vätskor används är mera sparsamt rapporterade under 70-talet. Bland senare applikationer kan nämnas att dukar eller nät av nylon impregnerade med etylenglykol eller silikonolja (150,154) för adsorption av pesticider i luft. Desorptionssteget skedde här via Soxhletextraktion. Holman och Heimermann (158) införde en pumpolja för vacuumbruk (poly-

fenyleter, Convalex 10) vid adsorption av flyktiga föreningar från orkidéer. Som bärare användes glasfiberpapper, vilket gjorde absorptionsmedlet lätthanterligt. Denna teknik har vidareutvecklats inom vår forskningsgrupp i Mölndal, vilket redovisas under punkt 10. En generell uppfattning har vidareutvecklats inom vår forskningsgrupp i Mölndal, ter problemets art, dvs polära stationära faser är att föredra vid anrikning av polära flyktiga föreningar och vice versa. Vid arbete med oxidationskänsliga substanser bör också en antioxidant tillsättas (134,144).

Användning av högkokande vätskor vid adsorption förutsätter värme vid desorptionssteget, vilket kan skada termolabila substanser. Detta kan undvikas genom att man kovalent binder den högkokande vätskan till en bärare, supportbundna faser. Därvid kan man använda sig av extration i desorptionssteget. Aue och Teli (168) har undersökt luftföroreningar med detta adsorptionsmedel och använder supportbundna silikoner, såsom $[C_{18}\ H_{37}\ SiO_{3/2}]_n$, på olika slags Chromosorb. Extraktion utfördes men pentan, varefter indunstning och analys med bl a GC gjordes. Senare har Pellizzari och medarbetare (169) använt andra supportbundna faser, såsom polyetylenglykol och oxipropionitril på Poracil C, såsom adsorptionsmedel i jämförande försök vid insamling och analys av modellsubstanser. Värme användes i desorptionssteget. Tyvärr föreligger alltför få rapporter om supportbundna faser i detta sammanhang för att en utvärdering skall kunna göras.

8.5.4 Syntetiska fasta polymerer

I tabell 22 har en sammanställning gjorts av några undersökningar med syntetiska fasta polymerer.

Williams och Umstead (170) samt Dravnieks och medarbetare (167) startade i slutet av 60-talet undersökningar av organiska föreningar i luft och använde sig av polymerer av

styren och divinylbensen (Porapak Q och S samt Chromosorb 102). Fördelarna med dessa framför andra adsorptionsmedel anses vara stor yta, låg diffusion, kemisk och termisk stabilitet samt stor retentionsvolym. En rad olika isoleringar, koncentreringar och analyser har sedan gjorts där dessa polymerer ingår, bl a vid analys av blomdoft från blåluzern (171), flyktiga komponenter från alkoholhaltiga drycker (172), pesticider ur luft (117) samt luftföroreningar i allmänhet (182,190,192). 1973 visade Zlatkis och medarbetare (175) att en polymer av 2,6-difenylparafenylenoxid (TENAX) var mycket effektiv såsom adsorbent i samband med analys av bl a flyktiga metaboliter ur urin (176). Ytterligare undersökningar har gjorts med andra polymerer, såsom Chromosorb 101, 104, 105 och 106 (186,195,199), Porapak N, P och R (164,195) samt XAD-2 harts (191). Jämförande försök med modellsubstanser gav vid handen att TENAX är att föredra vid adsorption av flyktiga föreningar med hög molekylvikt (195,199) beroende på dess termostabilitet vid den höga desorptionstemperatur som härvid krävs. Chromosorb 105 visade högre adsorptionskapacitet än TENAX samt hade större termostabilitet än Chromosorb 102 (199). I likhet med tidigare diskussion om olika adsorbtionsmedel gäller även här att man bör välja en opolär polymer för adsorption av en opolär flyktig förening och vice versa. Avslutningsvis bör nämnas att de fasta polymererna kan uppvisa artefakter i form av sönderfallsprodukter. Detta har rapporterats bl a för TENAX (198) och Porapak Q (173).

9 SEPARATION OCH IDENTIFIERING AV VÄXTSUBSTANSER MED SPECIELLT ANPASSAD GC-MS

De flesta växtsubstanser förekommer i mycket komplexa blandningar och dessutom ofta i mycket små mängder. De är också i allmänhet lätt nedbrytbara. Detta ställer speciella krav på analysinstrument såsom hög separationsförmåga, hög känslighet och milda betingelser för proven.

9.1 Åtgärder för ökning av ett GC-MS instruments prestanda

Hög separationsförmåga uppnås genom att använda långa kapillärkolonner av glas och ett speciellt insläppssystem. Hög känslighet erhålls genom att optimera masspektrometerns parametrar. Milda betingelser för substanserna erhålls genom att alla delar som kommer i kontakt med provet tillverkas av inert material, t ex glas, och har en så låg temperatur som möjligt.

9.1.1 GC-MS instrumentets känslighet

Följande faktorer, som allmänt gäller för ett GC-MS instrument med elektronjonisation, ökar dess känslighet:

Insläppssystem:

1 Minskad förlust av prov vid injektion på kolonnen
2 Minskad förlust av prov vid insläpp till MS

Jonutbyte:

3 Ökad koncentration av substans i jonisationskammaren
4 Ökad elektronström
5 Ökad elektronenergi
6 Ökad accelerationsspänning
7 Förbättrad fokusering av elektron- och jonström
8 Ökad spaltvidd (större spaltvidd minskar masspektrometerns upplösning)
9 Förbättring av vacuum i masspektrometerns jonkällehus och analysator

Registrering:

10 Ökning av antalet registrerade joner

11 Förbättring av signal-brusförhållandet hos detektor och förstärkare

Övrigt:

12 Minskad bakgrund från kolonn och vacuumsystem

Det är således många faktorer som påverkar instrumentets känslighet. Flera av dessa är bestämda av instrumentets konstruktion, medan andra kan påverkas av operatören. Till exempel genom bättre val av stationär fas i kolonnen erhålls skarpare separation och därmed högre koncentration av substans i jonkällan, vilket ökar känsligheten (pkt 3). Ett bättre val av fas minskar också bakgrunden från kolonnen och detta bidrar till ökad känslighet (pkt 12).

9.1.2 Gaskromatografens separationsförmåga

För att erhålla hög separationsförmåga används långa glaskapillärkolonner. Dessa ställer speciella krav på gaskromatografen, då en kapillärkolonn arbetar med mycket mindre flöden och provmängder. Följande egenskaper hos en gaskromatograf som är avsedd för kapillärkolonner är viktiga:

- Stor rymlig ugn med kraftig luftcirkulation
- Noggrann temperaturprogrammering som förutsätter god isolation av ugnen
- Vid arbete med lättflyktiga substanser behövs en kylanordning i ugnen
- Injektionssystem utan splitter (delare) med liten dödvolym och som tillåter snabb injektion på kolonnen
- Liten dödvolym i anslutningen efter kolonnen och i detektorn
- Bärgasflödet måste kunna hållas konstant i området 0,5-5 ml/min
- Snabb detektorförstärkare och skrivare (mindre än 0,5 sekunder för fullt utslag).

Kapillärkolonnens separationsförmåga beror förutom på kolonnens preparering och längd även på bärgasflödet, kolonnens temperatur, fördelningsjämvikterna mellan den fasta och den rörliga fasen, dvs på valet av fas och slutligen på injektionstekniken (200,202).

För att bibehålla den erhållna separationen fram till masspektrometern eller detektorn är det mycket viktigt att volymen i ledningen efter kolonnen är så liten som möjligt. Detta innebär att ledningen måste vara kort.

9.2 Beskrivning av ett GC-MS instrument speciellt anpassat för analys av växtsubstanser

Det GC-MS instrument som beskrivs nedan är byggt vid avdelningen för biokemisk ekologi. Masspektrometern är en enkelfokuserande typ med stor 90° magnetisk sektor. En specialbyggd gaskromatograf för kapillärkolonner är direkt kopplad och monterad vid masspektrometerns jonkällehus.

9.2.1 Gaskromatografen

Ugnen i gaskromatografen har dubbel isolering. Förutom ugnens stomme, som utgöres av isolerblock omgivna av rostfri plåt, finns en invändig låda av perforerad rostfri plåt. Denna är isolerad med 15 mm glasull, vilket ger ugnens inre del låg värmekapacitet. Ugnen blir på detta sätt temperaturföljsam.

I botten på ugnen finns fläkt och uppvärmningselement och dessutom rörslingor för kylvatten. Kylslingorna används dels vid nedkylning av ugnen och dels för noggrann temperaturprogrammering vid temperaturer under 100° C.

9.2.2 Glaskapillärkolonnen

I gaskromatografen används huvudsakligen glaskapillärkolonner. Dessa har formen av en spiral med 50-100 mm diameter och är mellan 25 och 150 meter långa. Kolonnens inre

diameter är ofta omkring 0,5 mm. För att erhålla noggrann temperaturföljsamhet hos kolonnen monteras denna i en hållare så att slingorna blir åtskiljda. Bärgasledningarna utgöres av stålrör som invändigt är belagda med glas, s k GLT rör[x]. Kopplingarna mellan glaskolonnen och bärgasledningarna är monterade på kolonnhållaren och tätningarna består av grafitkoner (Graphlok[x]). Genom att varje kolonn har en egen hållare kan byte mellan kolonner med olika faser eller längder ske snabbt.

9.2.3 Insläppssystemet till GC

Insläppssystemet består av följande delar (se Figur 6 och 7):

- Provkapsel som är tillverkad helt i glas. En utdragen glaskapillär fungerar som injektionsnål (se Figur 8)
- Vattenkyld desorptionsugn
- Injektionsblock som invändigt är av glas
- Kylfälla med snabb uppvärmning tillverkad av GLT rör

Injektion av prov på kolonnen sker enligt följande beskrivning (se Figur 6):

Desorptionsugnen kyls med kallvatten. Dewarkärlet omkring kylfällan fylls med flytande kväve. Provkapsel med prov placeras i desorptionsugnen och desorptionsgasen anslutes. Gasen genom provkapseln kan ha något större flöde än den gas som normalt går genom kolonnen. På detta sätt erhålles en indikering på att flödet förbi provet är tillräckligt.

Gasen får passera provet någon minut för att luften i kapseln skall tränga ut. Provkapselns "nål" sticks sedan genom injektionsmembranet. Om adsorptionsmedel används, värms detta med desorptionsugnen till ca 150° C. Utgöres provet av färskt växtmaterial, får avgivningen ske vid 15-40° C, bl a berorende på provets vattenhalt. De avgivna substans-

x) Scientific Glass Engineering Pty

serna från provet leds genom injektionsblocket till kylfällan där de kondenserar.

När desorptionen är klar, dras "nålen" ut och bärgasen öppnas. Efter cirka 5 minuter, när bärgasflödet har stabiliserats, värms kylfällan mycket snabbt genom att en elektrisk ström på omkring 8 ampere leds genom den under en bestämd tid. Kylfällan är tillverkad av invändigt glasbelagt rostfritt stålrör, som har lämpligt elektriskt motstånd. Tidpunkten när kylfällan värms markeras och retentionstiderna relateras till denna. Temperaturprogrammeringen av ugnen startas också vid denna tidpunkt och sker med 1-4° C/minut från 20-50°.

Med denna insläppsmetod erhålles en mycket snabb och distinkt "injektion" på kolonnen, vilket förbättrar kolonnens separationsförmåga speciellt för de flyktigaste komponenterna. Reproducerbarheten hos retentionstiderna ökar och ytterligare fördelar är att desorptionstiden kan göras obegränsat lång och att olika stora provkapslar kan användas.

Injektionstekniken bygger på koncentrering av provet. Detta medför ett mycket högt renhetskrav på alla ingående delar i injektionssystemet, då föroreningar kan koncentreras i kylfällan och bli besvärande. Mycket hög kvalitet på injektionsmembranet krävs liksom mycket ren bärgas (200,203).

9.2.4 Koppling kapillärkolonn-masspektrometer

Flödet från kapillärkolonnen leds direkt till masspektrometern utan att bärgasen separerats genom ett GLT-rör. Röret är cirka 150 millimeter långt och leder gasen igenom ett uppvärmt insläppsblock in till jonkällan. Inne i blocket är GLT-röret skarvat med ett glaskapillärrör. Detta rör är utdragbart utifrån och leder gasen den sista biten in i jonisationskammaren. För att minska volymen i ledningen saknar den avstängningsmöjlighet. Det medför att vid byte

av kolonn måste vacuum i masspektrometerns jonkällehus brytas. För att kolonnbyte ska kunna ske snabbt kan jonkällehuset isoleras från övriga vacuumsystemet som därför inte behöver stängas av. Vid nedpumpning av jonkällehuset används en separat förvacuumpump innan ventilerna till högvacummpumparna öppnas. Kolonnbyte och återställande av vacuum kan normalt ske på 1/2-1 timme (200,201,204,205).

9.2.5 Beskrivning av masspektrometern

Masspektrometern är av enkelfokuserande typ med 90° magnetisk sektor med stor radie (300 mm). Instrumentet är byggt på ett stabilt bord med en 100 mm tjock diabasskiva. Vacuumsystemet består av två förvacuumpumpar och tre oljediffussionspumpar (se Figur 6). Diffussionspumparna är anordnade så att den större (900 l/min) pumpar direkt vid jonkällan medan de två mindre är anslutna till analysatorröret respektive detektorn. Utträdesspalten vid jonkällan (0,1-0,3 mm) utgör hela öppningen mellan jonkällan och analysatordelen. Med detta pumpsystem erhålls cirka 10 ggr bättre vacuum i analysatorn (10^{-6} torr, 10^{-4} Pa) än vid jonkällan (10^{-5} torr, 10^{-3} Pa) uppmätt vid fullt bärgasflöde (5 ml/min, NTP).

Magneten är tillverkad av homogent kiseljärn och har planslipat 10 mm brett polgap. Magnetspolarna (2 st) matas från ett programmerbart kraftaggregat som maximalt lämnar 12 ampere. Maximal magnetisk fältstyrka blir då cirka 11000 gauss, vilket med 3000 volt accelerationsspänning motsvarar ett masstal på omkring 2000 m/e.

Jonkällan är kombinerad för både elektron- och fältjonisation och är av fabrikat Atlas, typ EFO-4B. Enbart elektronjonisation har använts hittills. Kapillärröret från kolonnen går in i jonisationskammaren och slutar cirka 1 mm från elektronströmmen.

Jonisationsgraden har beräknats genom injektion av en bestämd mängd kolväte (pentadekan) på kolonnen. Signalstyrkan på registreringen av den totala jonströmmen från kolvätet enligt registreringsmetoden som beskrivs nedan har bestämts. Vid de ovannämnda trycken erhålls cirka 0,002 joner per introducerad molekyl.

9.2.6 Registrering av gaskromatorgrammet

För att erhålla en känslig registrering av gaskromatorgrammen trots att hela bärgasflödet leds in i masspektrometern används en speciell metod. Principen framgår av Figur 6. Vid en viss magnetisk fältstyrka kommer joner som har liten massa att böja av med en relativt liten radie och dessa träffar därför inte elektroden E. Joner med större massa, t ex M_2 får däremot en större radie och träffar elektroden. Joner som träffar elektroden lämnar sin laddning på denna och genom att mäta spänningen på elektroden kan jonerna registreras. Man kan på detta sätt vid registreringen separera lättare joner från tyngre. Gränsen mellan dessa bestäms av fältstyrkan och den kan enkelt regleras med magnetströmmen.

Fördelen med den beskrivna anordningen är att joner som härrör från bärgasen inte registreras. Även tyngre joner som kväve och syrejoner från luft samt joner från vatten kan vid behov separeras. Registreringen blir då okänslig för mindre mängder vatten i provet, för små ändringar i bärgasflödet och dessutom för små luftläckor. Den viktigaste fördelen är att jonisation kan ske vid hög elektroenergi som ger högt jonutbyte även vid registrering av gaskromatorgrammet. Signal-brusförhållandet blir betydligt förbättrat och eftersom signalen är nära noll då inget prov passerar kan en mycket känslig förstärkare utan s k nollundertryckning användas. Detekteringsgränsen på GC registreringen är för närvarande cirka 10 pico-gram (10^{-11} gram injicerat kolväte) men bör kunna öka ytterligare. Detta

kan ske bl a genom att signalen förstärks direkt vid elektroden

9.2.7 Konstruktion av massmarkerare med linjär masskala

Teori:

För en masspektrometer med magnetisk sektor gäller:

$$M = \frac{B^2R^2}{2\,U} \qquad (1)$$

där M = masstal m/e
B = magnetisk fältstyrka
R = magnetiska sektorns radie
U = accelerationsspänning

Om R och U är konstanta kan (1) skrivas:

$$M = K_1.B^2 \qquad (2)$$

där K_1 = en konstant liksom K_2, K_3 osv

För att masskalan ska vara linjär måste S som är sträckan mellan M = O och M uppfylla villkoret:

$$S = K_2.B^2 \qquad (3)$$

Derivering av (3) med avseende på tiden ger pappershastigheten v(t):

$$v(t) = \frac{dS}{dt} = K_2.B.2.\frac{dB}{dt} = K_3.B\,\frac{dB}{dt} \qquad (4)$$

Dvs om skrivarpappershastigheten är proportionell mot den magnetiska fältstyrkan multiplicerad med dess derivata blir masskalan linjär.

Derivaten $\frac{dB}{dt}$ kan mätas med en spole i magnetfältet enligt

induktionslagen:

$$e(t) = - N \frac{dQ}{dt} \qquad (5)$$

är e = induktionsspänning
Q = magnetisk flödestäthet
N = antal varv i spolen

Om A är spolens area gäller:

$$B = A.Q \qquad (6)$$

och då A och N är konstanta kan (5) skrivas:

$$e(t) = K_4 . \frac{dB}{dt} \qquad (7)$$

Fältstyrkan B kan mätas med t ex en hallgenerator. Den kan också mätas genom att integrera spänningen från spolen. Integreras (7) erhålls:

$$B = K_4 . \int dB = K_5 . \int e(t)dt \qquad (8)$$

Insättes (7) och (8) i (4) får vi:

$$v(t) = K_7 \, e(t) . \int e(t)dt \qquad (9)$$

Integrering av (9) masstalet M:

$$M = K_8 . S = K_9 \int e(t) \cdot (\int e(t)dt)dt \qquad (10)$$

Funktionsbeskrivning:

De i beskrivningen använda beteckningarna återfinns i blockschemat Figur 9.

Givaren i magnetfältet är en dubbelspole vars lindningar är lindade motsatt varandra. Enbart de förstärkta positiva spänningarna från dessa omvandlas till en proportionell frekvens i frekvensomvandlaren VF1 och VF2. Vid ökning av magnetfältet erhålls pulser från VF1 och dessa adderas i den binära räknaren R och vid minskning av fältet erhålls pulser från VF2 som subtraheras i räknaren. Räknarens binära utsignal blir då ett mått på magnetfältets styrka. Räknarens utgång är kopplad till en multiplicerande digital-analog omvandlare MDA. MDA multiplicerar den binära signalen från räknaren med den analoga signalen från spolen. Utsignalen från MDA omvandlas därefter i VF3 till en proportionell frekvens som styr en stegmotor SM och ett stroboskop. Stegmotorn driver papperet i galvanometerskrivaren och masskalan blir då linjär. Stroboskopet kan användas för att markera varje masstal. Resultatet exemplifieras i Figurerna 36-39.

Genom att låta stegmotorn styras av pulser från VF1 och VF2 i stället för VF3 erhålls en kvadratisk masskala.

10 ANALYSMETODIK OCH ANALYSRESULTAT

De inledande beteendetesten (punkt 7) liksom våra första kemiska analyser av växtmaterialet visade att nästa led i projektarbetet måste bli utformande av en optimal teknik för en analysgång, som innefattar isolering, koncentrering och identifiering av växternas försvarssubstanser. Metodikundersökningen (under punkt 8) samt de erfarenheter som erhållits, bl a på modellobjektet timjan, har gett följande:

Man måste erhålla en sann bild av både den kvalitativa och kvantitativa sammansättningen av en komplex blandning flyktiga komponenter, vilka kan förekomma i mycket stora och små mängder tillsammans samt kan vara både foto- och oxidationskänsliga och termolabila.

Eftersom växtsubstanser produceras i mängd och sammansättning efter en viss dygnsrytm, är den ideala analysmetodiken att ta kontinuerliga stickprov av luften i omedelbar närhet av växten på dess naturliga växtplats för omedelbar analys med GC-MS. Detta är fullt genomförbart om de intressanta försvarssubstanserna förekommer i tillräcklig koncentration. Prov kan tagas med gastät spruta för direkt injektion på GC-kolonnen. Luft från växtmaterial kan också svepas in i en kylfälla, där kondensering sker, i direkt anslutning till GC-kolonnen, vilket är beskrivet under punkt 9.2.3. Allt detta under förutsättning att vatten inte påverkar analysresultaten (punkt 8) samt att färskt växtmaterial finns tillgängligt i omedelbar närhet av den svårflyttade analysutrustningen. Punkt 8 gav vid handen att de isolerings- och koncentrationsmetoder som finns beskrivna kan användas för varje problemställning som uppkommer inom analysgången. Det metodik som tycks mest lämpad för att isolera och samtidigt koncentrera en provblandning är adsorptionstekniken. Den rymmer i sig flest möjligheter att skydda provet från artefakter. Inom vårt projekt har vi koncentrerat oss på försök med högkokande vätskor på glas-

fiberpapper (Reeve Angel 934 AH), eftersom man kan välja adsorptionsmedel bl a inom det stora registret av stationära faser för GC.

Adsorptionen sker på följande sätt (se Fig. 5, modell A): Växtmaterialet placeras på aluminiumfolie. Över detta ställs en glaskupa med tre symmetriskt placerade provkapslar (se figur). Med hjälp av tre vacuumflödesregulatorer (Porter Instrument Company, modell 8298) erhålls konstant och lika flöden (20 ml/min) genom provkapslarna. En mekanisk förvacuumpump ger flödet i systemet och är placerad skild från den övriga uppställningen. Den mängd växtmaterial som behövs vid användning av provkapslar för 0,2 gram adsorptionsmedel ligger mellan 1 och 5 gram beroende på växtmaterialet vid normal adsorptionstid (30-60 minuter). När adsorptionen är klar analyseras provet direkt eller förvaras det i provrör med tättslutande skruvlock vid -30°C. Denna möjlighet att lagra adsorberade prover gör att analysen kan ske vid lämpligt tillfälle och att jämförelser kan göras mellan adsorption med olika adsorptionsmedel från ett och samma försök.

En vidareutveckling av modell A utgör B (Fig. 5), där försöksbetingelserna är mer kontrollerade. Försökskärlet utgöres av en odlingskolv med planslipad fläns för lock med normalslipningar (NS 19) för provkapslar och lufttillträde. Temperaturen vid försöket kan göras konstant genom att kärlet nedsänkes i ett termostatreglerat vattenbad. Luften som sveper över växtmaterialet kan också befrias från organiska föroreningar genom ett kolfilter. Detta är av betydelse då det gäller att undvika s k bakgrundsdofter vid adsorption från växtmaterial med låg produktion av flyktiga substanser. Dessutom absorberas ej vatten i nämnvärd grad i kolfiltret, vilket medför att växten kan avge doftsubstanser under så naturliga betingelser som möjligt.

10.1 Utvärdering av den med växtobjektet timjan utformade analysmetodiken

De adsorptionsmaterial som hittills använts i timjanförsöken är följande:

Convalex-10 (polyfenyleter, Leybold-Heraeus)
Santovac-5 (polyfenyleter, Monsanto)
Lion S (alkylnaftalenolja, Vacuumservice AB)
OV-17 (fenylmetylsilikon, Applied Science)
XE-60 (cyanoetyl-metylsilikon, Applied Science)
SE-30 (metylsilikon, Applied Science)
Chromosorb 102, 100/120 mesh (Regis)
TENAX GC, 35/60 mesh (Applied Science)
Porapak Q, 100/120 mesh (Waters)
Carbopak B, 60/80 mesh (Supelco)

Även Poly MPE (polymetafenoxylen, Applid Science), DC 550 fenylmetylsilikon, Applied Science) och polypropylenglykol (Applied Science) har testats, men dessa visade sig ge sämre adsorption.

Den litteratur som finns tillgänglig för timjan beskriver endast analys av flyktiga komponenter ur oljor eller liknande extrakt. I Figurförklaringarna 1 och 2 redovisas de flyktiga föreningar som identifierats via adsorptions- och direktmetodiken. Numreringen framför föreningarnas namn relateras till fraktionerna i gaskromatogrammen (Fig. 10-27).

En direkt jämförelse mellan flyktiga komponenter från färsk resp torkad timjan, vilka absorberas i kylfälla direkt för GC-MS kan göras via Fig. 22, 23 och 27. Stora skillnader finns. Bl a saknas tymol och carvacrol i färskt material (se punkt 10.2). Dessutom är vattentoppen tydlig i båda fallen. Det färska materialet är sålunda att föredra, då det bör återspegla en så naturlig sammansättning av flyktiga föreningar som möjligt.

De kolonnmaterial som använts i GC-delen är den opolära silikonfasen SE-30 och den mera polära polyetylenglykolen Carbowax 20 M. Fig. 15 och 25 ger skillnaderna i gaskromatogrammen där doft adsorberats med TENAX under lika betingelser i båda fallen. Bl a separeras caryofyllen bättre på SE-30 fasen. Därför bör olika GC-kolonner med olika polaritet användas för en mer fullständig separation av en blandning.

Reproducerbarheten av gaskromatogrammen efter adsorption-desorption bevisas av direkta jämförelser mellan Fig. 13 och 16 där adsorptionsmedlet är SE-30 samt motsvarande jämförelser mellan Fig. 10, 14 och 20, där medlet är det mera polära XE-60. Emellertid uppträder mindre variationer mellan kromatogrammen i Fig. 13 och 16, där t ex kamfer saknas i Fig. 13. Detta beror på individuella variationer hos timjan, då provtagning i detta fall skedde från olika plantor.

Vid försök med syntetiska fasta polymerer såsom TENAX-GC och Chromosorb 102 (Fig. 15 och 19) visar det sig att Chromosorb adsorberar vatten,vilket gör att dess provkapacitet minskar i förhållande till TENAX. Detta är helt i överensstämmelse med litteraturuppgifter (punkt 8). Jämförelser under likartade betingelser mellan adsorption på högkokande vätskor, såsom SE-30 Santovac-5, Lion S och XE-60, vilka representeras av gaskromatogrammen i Fig. 16, 17, 18 och 20 (kolonn: SE-30) ger en enhetlig bild vid första anblicken. Vid detaljgranskning ser man emellertid att de opolära faserna ger opolära substanser företräde vid adsorption och vice versa. Detta exemplifieras av den relativt opolära p-cymen, vilket ger en mycket kraftig topp vid adsorption på SE-30 och en mindre vid adsorption på bl a XE-60. Omvänt ser man att det syreinnehållande kamfer ger en större topp i Fig. 20 (XE-60) än i Fig. 16 (SE-30). Motsvarande resultat har erhållits i försök med polär kolonn (Carbowax 20M)

enligt Fig. 24-26. Dessa exempel styrker också litteraturuppgifter under punkt 8.

Jämförelse mellan adsorption på syntetiska fasta polymerer och högkokande vätskor, t ex TENAX i Fig. 12, SE-30 i Fig. 11 och XE-60 i Fig. 10, ger vid handen att de högkokande vätskor SE-30 och XE-60 adsorberar i högre grad svårflyktiga komponenter än vad TENAX gör. Detta visar att de högkokande vätskorna är ett komplement till de fasta polymererna, eftersom TENAX enligt litteraturuppgifter (195, 199) är den polymer som har bäst adsorptionsförmåga för mera svårflyktiga föreningar. Denna undersökning tillsammans med litteraturuppgifter visar att det finns inget allround adsorptionsmedel som adsorberar hela skalan av polära såväl som opolära föreningar av varierande flyktighetsgrad. En lämplig kombination av olika adsorptionsmedel (t ex TENAX, SE-30 och XE-60) bör därför användas.

10.2 Synpunkter på växternas försvarskemi med utgångspunkt från timjansresultaten

Den teori för biokemisk samevolution mellan växter och växtätare som sammanfattas i inledningen till denna forskningsrapport (punkt 1) har mognat fram så småningom man har bäst formulerats av Feeny (35) och Rhoades & Cates (36). En konsekvens av denna teori är att växternas självförsvar mot växtätare bl a är ett energiproblem i ämnesomsättningsbudgeten. Urvalsfaktorerna har gynnat en energisnål kvalitativ lösning hos svårupptäckta växter och ett mer energikrävande kvantitativt kemiskt försvar hos lättupptäckta växter. Evolutionen bör även ha främjat en optimal fördelning av växtens försvarsresurser i tid och rum. En kvantitativ undersökning av försvarssubstanserna hos ett antal pilotarter bland de lättupptäckta växterna, dit ju flertalet av våra kulturväxter hör, är därför av mycket stort intresse.

De tre sista översiktsartiklarna (206,207,208) i den vartannat år utkommande serien "Essential Oils and Related Products" upptar tillsammans över 2000 referenser. De refererade artiklarna är huvudsakligen deskriptiva och bygger till övervägande del på analys av genom destillation framställda essentiella oljor med de risker för artefakter som framgår av den här redovisade metodikundersökningen.

Timjan har som nämnts varit föremål för ett stort antal kemiska undersökningar (63 referenser fr o m 1960) men även dessa är huvudsakligen analyser av essentiella oljor erhållna genom destillation eller extraktion. Granger et. al. (209, 210) uppger att den franska timjanoljans kemiska variabilitet beror på förekomsten av sex kemotyper hos Thymus vulgaris. Oljan från var och en av dessa kemotyper kännetecknas av en dominerande typsubstans (geraniol, linalol, α - terpineol , thujanol-4 och terpineol-4, tymol, carvacrol), av vilka den har högre halt än övriga kemotyper. Kemotyperna har hållits i kultur i flera år och har befunnits stabila även i naturliga habitats. De genetiska och ekologiska faktorer som bestämmer fördelningen av kemotyperna i populationerna har också studerats (211). Sådana undersökningar är ett steg i rätt riktning även om en del frågetecken kvarstår beträffande den sparsamt redovisade kemiska analysmetodiken.

Vikten av en varsam analysgång framgår av Fig. 28. Tymol och carvacrol betecknas i de flesta undersökningar som karaktärssubstanser för timjan. Vi har inte kunnat påvisa dessa substanser i spontant avgiven doft från färskt timjanmaterial. I stället avges en motsvarande mängd tymolmetyleter och carvacrolmetyleter (Fig. 22 och 23). Däremot uppträder tymol och carvacrol i doften från torkad timjan.

Nästa steg mot ökad förståelse av växternas försvarskemi är utan tvivel en kartläggning av den instraspecifika va-

riationen i produktionen av allelokemikalier även inom den enstaka plantan.

10.3 Metodikens tillämpbarhet på andra växter

Hjälpmedel vid identifieringen av masspektra från flyktiga växtsubstanser har varit dels litteraturuppgifter (212,213) dels masspektra lagrade på dator (DEC-10, Avdelningen för strukturkemi, G U). Gaskromatorgrafiska och masspektrometiska data har verifierats med referenssubstanser.

Lomme (Capsella bursa pastoralis)

Analys av adsorberande substanser från djupfryst lomme visas dels genom gaskromatorgrammet i Fig. 29, dels i Figurförklaring 3. Att notera är de svavelinnehållande substanser, vilka kan härledas från glykosinolater, som genomgående finns hos korsblommiga växter.

Tomat (Solanum lycopersicum)

Analys med kondensering av spontant avgivna föreningar från djupfrysta unga tomatskott gav kromatogrammen i Fig. 31 och 32. Skillnaden mellan dessa analyser är att separationen har skett med olika kolonner (SE-30 resp Carbowax 20 M). De föreningar som har identifierats finns upptagna i Figurförklaring 4.

En jämförelse av analysmetoderna adsorption på TENAX (Fig. 30) och direkt kondensering i kylfälla (Fig. 31) ger att de erhållna kromatogrammen överensstämmer väl. Detta gäller såväl kvalitativt som kvantitativt med undantag av den mest flyktiga (högra) delen av kromatorgrammen. (Jämför den undre kurvan i Fig. 30 med den övre i Fig. 31). Fig. 37-39 visar masspektra av tre identifierade föreningar från tomatskott, α-terpinolen, limonen och humulen.

Gyllenlack (Cheirantus cheirii)

Fig. 33 visar gaskromatogram från doft av gyllenlack, adsorberad på TENAX-GC. En enda markant fraktion finns i se-

nare delen av kromatogrammet. Denna fraktion visade sig bestå av 3-metyltiopropylisotiocyanat $CH_3S(CH_2)_3NCS$, vars masspektrum finns i Fig. 36 (214). Detta är ett ovanligt glykosinolat med tänkbar effekt på äggläggningen (37).

Åbrodd (Artemesia abrotanum)
Fig. 34 visar gaskromatogram från färsk åbrodd. Ett tjugotal fraktioner kan påvisas, vilka kommer att identifieras.

Fläder (Sambucus nigra)
Analys av adsorberade föreningar från djupfrysta fläderblad på glasfiberpapper impregnerat med SE-30 gav gaskromatogrammet i Fig. 35. Den största fraktionen (märkt: BA) har identifierats som benzaldehyd, C_6H_5CHO.

11 VÄXTÄTARNAS SJÄLVKONTROLL MOT ÖVEREXPLOATERING AV NÄRINGSTILLGÅNGARNA

11.1 Påvisande av äggutspridningsferomoner hos kålfjäril

Vi samarbetar på detta område med Rothschild (Ashton Wold, Peterborough, England) och Schoonhoven (Lantbrukshögskolan, Wageningen, Nederländerna). Följande iakttagelser och preliminära försöksresultat av dessa forskare ligger till grund för vår bedömning att äggferomonerna kan vara av praktiskt intresse för detta projekt för alternativa kontrollmetoder.

Glykosinolater utgör äggläggningsstimulanter för kålfjäril. Om äggläggande kålfjärilar samtidigt erbjuds blad av kål och blad av en annan glykosinolatväxt, t ex indiankrasse (Tropaeolum), utanför den egentliga värdväxtfamiljen Cruciferae, läggs äggen först på kål. Först sedan kålbladen fått en viss äggbeläggning börjar äggläggningen på indiankrasse. Denna primäriakttagelse har följts upp med försök som visar att Pieris brassicae lägger färre ägg på blad med

A ägg av kålfjäril
B äggatrapper av gul plast
C vätska från krossade ägg
D ätande kålfjärilslarver

samt även på blad från vilka äggsamlingarna har avlägsnats. Resultaten med modelläggen samt med grönmålning av riktiga gula kålfjärilsägg tyder på att visuell stimulii hjälper honorna att uppskatta ett blads lämplighet för äggläggningen. Minskningen av antalet "flygvisiter utan bladkontakt" vid blad med gömda ägg, äggvätska eller från vilka äggen avlägsnats tyder på att på avstånd förnimbara doftsignaler från redan lagda ägg är verksamma. Reduktion av antalet "honnedslag" på experimentblad med många ägg eller nedsmetade med äggvätska talar för att kontaktkemoreception vid det typiska trummandet på bladet med frambenen också är av betydelse vid uppskattningen av äggbeläggningen på bla-

det. Iakttagelser av fjärilarnas beteende stöder dock närmast hypotesen att luftburna feromon från äggen är den mest betydelsefulla faktorn när det gäller att avskräcka kålfjärilshonorna från fortsatt äggläggning. En rapport om dessa resultat har publicerats i Nature(215).

Markeringsferomon av denna typ är inte tidigare kända bland fjärilarna men är däremot vanliga bland parasiterande insekter. Liknande resultat från några få försök med äggläggning hos Pieris rapae och Danaus plexippus antyder att det kan vara fråga om ett vanligt men hittills förbisett fenomen hos fjärilar.

En intressant företeelse är bladbildningar i form av falska ägg och larver hos vissa växter som t ex Passiflora. Detta måste utgöra svaret på ett starkt ättryck av fjärilslarver. Det måste vara av praktiskt intresse att undersöka doften hos dylika förmodade specialiserade försvarsanordningar hos växterna.

11.2 Identifiering av från äggen frigjorda substanser

De äggferomoner som honan producerar synes av beteendet att döma att impregnera äggens yta eller att bakas in i den cement, som fäster äggen vid bladytan.

Nylagda ägg (ca 3-5000) skrapades försiktigt bort från kålbladens undersida och placerades i en bägare tillsammans med adsorptionspapper. Som adsorptionsmedel har testats Convalex-10, Santovac-5, XE-60 och SE-30. GC-MS analys av doften visade att de framträdande fraktionerna bestod av smörsyra, linalol, Δ 3-caren och limonen. Ägg har även placerats direkt i gaskromatografens insläppssystem för analys. Installation av en kylfälla omedelbart före kapillärkolonnen (punkt 9.2.3) gav ytterligare ett antal separerade fraktioner på kromatogrammet som ännu inte analyserats därför att vi inte haft tillräckligt med ägg. Exemplet illust-

rerar både vikten av metodutveckling och faran av att lita på en analysmetodik.

11.3 Beteendetest av äggsubstanser

Smörsyra har konstaterats utgöra en av komponenterna i den adsorberade äggdoften. Detta resultat väckte vissa förhoppningar eftersom smörsyra har konstaterats verka som repellent på "the alfalfa seed chalcid", Bruchophagus roddi Guss. (216). Denna substans är däremot inte en verksam äggläggningsdeterrent för kålfjäril (tab 23-25) åtminstone inte inom det koncentrationsområde, som utmärker de kvalitativa delarna av det kemiska växtförsvaret.

En kombination av smörsyra och linalol ger däremot en viss deterrentverkan, 1:1,7 (tab 26) men inte starkare än enbart linalol (tab 11 och 12). Ett inledande försök med limonen redovisas i tabell 27. En bit glasfiberpapper som impregnerats med några droppar av limonen placerades vid basen av testkålbladet.

Den äggläggningsdeterrerande effekten på kålfjäril av ätspår efter de egna larverna aktualiserade en undersökning av cis-hex-3-enol-1 och trans-hex-2-enals roll i detta sammanhang. Dessa substanser är så vanligt förekommande i gröna blad att de blivit kallade "bladalkohol" och "bladaldehyd". De förekommer även inom djurriket bl a hos en kackerlacka (Periplaneta americana). Försvarssekretet består hos denna art av nästan 100 % ren aldehyd som är kraftigt toxisk för andra insekter. I kål förekommer substanserna huvudsakligen i de yttre delarna av växten och frigörs när växten skadas, troligen enzymatiskt (217). Halten av bladaldehyd och bladalkohol fördubblas om upptäckbarheten ökas genom att kålplantorna får växa tätt intill varandra. Även detta tyder på att substanserna ingår i det naturliga kemiska försvaret. Beteendetesten (tab 28 och 29) visar att den använda doftkoncentrationen (från 6x10ul sub-

stans i mikrokapillärer) är tillräcklig för att ge en påvisbar deterrentverkan på äggläggningen. Doften av samma mängd bladaldehyd verkar däremot attraherande medan 2 ml 0,1 viktsprocent vattenlösning av aldehyden penslad direkt på bladet verkar deterrerande. Resultaten tyder på att bladaldehyd och bladalkohol finns med bland de kemiska signaler som hjälper kålfjärilshonorna att undvika larätna och på annat sätt mekaniskt skadade blad vid äggläggningen. De spontant avgivna låga doftkoncentrationerna från oskadade blad kan däremot verka attraherande.

12 PRAKTISKT UTNYTTJANDE AV VÄXTERNAS FÖRSVARS-SUBSTANSER MED DET KEMISKA TOTALFÖRSVARET SOM UTGÅNGSPUNKT

De analysresultat som redovisas i denna forskningsrapport illustrerar väl den nästan frustrerande mångfalden i växternas produktion av allelokemikalier. Gaskromatogrammet i Fig. 13 visar t ex över 120 separade substanser. Det betyder att kartläggningen av deterrentverkan hos en viss växt innebär ett omfattande kemiskt identifieringsarbete och ett mycket stort antal beteendetest. Slutsatsen blir att det finns skäl att i stället söka angripa dessa problem med utgångspunkt från en kartläggning av det kemiska totalförsvaret. Beck et. al. (218) har påpekat att varje växtart innehåller ett typiskt komplex av allelokemikalier. Det är denna substansarsenal som en viss växtätare måste kunna klara av för att kunna utnyttja växten i fråga som näringsväxt.

12.1 "Läckogram" och "sårogram"

Behovet av substansutbyte genom membranerna gör att växterna i betydande utsträckning läcker organiska substanser, både ovan (219) och under jord (220). Sjö- och havsvatten innehåller större mängd organiska substanser i lösning än substansinnehållet i den sammanlagda planktonbiomassan (220). I stor utsträckning återanvänds sedan dessa organiska ämnen genom att de åter tas upp av levande organismer, t ex av högre växter genom rötterna (221).

Det är dessa s k systemiska egenskaper hos många av växternas allelokemikalier som gör att dessa ämnen är speciellt intressanta när det gäller att kontrollera kulturväxtskadegörare. En naturlig ätrepressor (tab 2) blir verkligt effektiv bara om den kan tas upp av växtvävnaderna och transporteras till nya växtdelar efterhand som de växer fram (79). I annat fall blir dessa utsatta för angrepp av skadegörare.

Ett praktiskt utnyttjande av växternas allelokemikalier för kontroll av skadegörande växtätare kräver inte obetingat att de aktiva substanserna identifieras och syntetiseras. När det gäller att utnyttja försvarssubstanserna inom kulturväxtarten själv, kan registrering av "läckogram" och "sårogram" vara till stor hjälp. Ett läckogram bör ge en bild av de ämnen som spontant avges från växten ifråga, ett sårogram bör återge de ämnen som avges när växtvävnaderna skadas.

De repressorer som skyddar växten genom att påverka de angripande växtätarnas äggläggning och ätbeteende bör ha selekterats från dessa substanser. Kapillärgaskromatogram av den typ som presenteras i detta arbete skall kunna användas som sådana läckogram och sårogram. Redan nu kan betydelsefulla slutsatser om växtens totalförsvar dras av sådana kromatogram, t ex kemisk originalitet jämfört med andra typer inom samma art, flera olika kemiska försvarslinjer som försvårar växtätarnas motanpassning. Alla dessa upplysningar är av största värde för växtförädlaren när det gäller hans huvudproblem att gallra i ett stort växtmaterial

Det som här framhållits gör att kunskaper om växternas allelokemikalier lättare kan praktiskt nyttiggöras jämfört med t ex feromoner där strukturbestämning och syntetisering som regel är nödvändig för en användning i kontrollsyfte.

Samtidigt med att tekniken för registrering av läckogram och sårogram förfinas avser vi givetvis att arbeta vidare för att identifiera och syntetisera repressorer hos växter som inte angrips av en viss kulturväxtskadegörare för att vid behov kunna förstärka det optimalt uppbyggda självförsvaret hos växten genom applicering av sådana hjälpsubstanser.

12.2 Växternas kemiska självförsvar - en naturlig grund för en integrerad kontroll

I inledningen framhölls att målet idag är att utifrån kunskap om våra jordbruksekosystem reglera skadedjurspopulationerna så att de hålls under gränsen för ekonomisk skada för de olika arterna. En sådan reglering av skadegörarna (pest management) kräver en noggrann samordning av olika kontrollmetoder (integrated pest control).

Enligt vår uppfattning styrker här redovisade resultat insatta i ett ekologiskt sammanhang påståendet att ett optimalt utformat kemiskt självförsvar, rätt utnyttjat genom lämpliga brukningsmetoder och utprövade grödekombinationer, vid behov förstärkt med utifrån applicerade försvarssubstanser från andra växter, är en modell för reglering av de skadegörande växtätarpopulationerna genom "hjälp till självhjälp" som förtjänar att systematiskt prövas.

13 STRATEGI FÖR DET FORTSATTA ARBETET

Den under föregående punkt redovisade diskussionen av möjligheterna att praktiskt använda växternas försvarssubstanser ligger till grund för följande arbetsplan:

13.1 Samarbete med resistensförädlare

De uppnådda resultaten pekar på att arbetet när det gäller pilotobjekten, kålfjäril (Pieris brassicae), rapsfjäril (P. napi) och rovfjäril (P. rapae) i fortsättningen bör bedrivas efter två linjer:

A Kartläggning av det kemiska totalförsvaret hos de drabbade kulturväxterna med läckogram och sårogram.

Den allelokemiska variationen hos olika kålsorter bör undersökas. I kålodlarenkäten uppger några uppgiftslämnare att de iakttagit resistenta kåltyper i sitt odlingsmaterial. Rödkål angrips enligt många odlare mycket litet av kålfjärilar. Detta stämmer med Rothschilds (215) och våra egna försök med äggläggande kålfjärilar.

I denna del av arbetet bör samarbete ske med resistensförädlare och de odlare som förklarat sig villiga att medverka vid försöken.

B Identifiering av äggläggnings- och ätrepressorer hos växtarter som inte angrips (av kålfjärilar).

En insamling av det i landet odlade sortimentet av tomatsorter har påbörjats. Avsikten är att genom jämförelse med vildtomat med hjälp av läckogram och sårogram kunna illustrera vilka konsekvenser växtförädlingen haft för denna art när det gäller produktionen av allelokemikalier som utgör det kemiska självförsvaret.

De påbörjade undersökningarna av de lovande arterna, gyllenlack och lomme skall fortsättas.

13.2 Tänkbara målarter för en kontroll av skadegörare med naturliga växtsubstanser

Den här redovisade arbetsstrategin kan användas för praktiskt taget vilken skadegörande växtätare som helst. Det fortsatta urvalet av målarter för projektet måste i fortsättningen ske efter ekonomiska bedömningar och i viss mån också efter arternas teoretiska intresse när det gäller vidareutveckling av tekniken. När det gäller de ekonomiska bedömningarna kan god hjälp förväntas av den år 1975 startade utredningen angående "Totalekonomisk bedömning av växtskadegörare inom jordbruks- och trädgårdsnäringen" med Statens råd för skogs- och jordbruksforskning som finansiär.

Eftersom pilotarterna är kålskadegörare ligger det nära till hands att tillämpa erfarenheterna på andra kålskadegörare, t ex kålflugor (Hylema floralis och H. brassicae).

Andra tänkbara objekt är de skogsskadegörande smågnagarna åkersork (Microtus agrestris L.), skogsmus (Clethrionmys glareolus Schreb.), större skogsmus (Apodemus flavicollis Melch.) och mindre skogsmus (Apodemus sylvaticus L.). Under vårt arbete med växtsubstanser verkande på insekter har vi stött på en rad uppgifter från odlare och i litteraturen om växtarter (t ex bondböna, kejsarkrona och en del lökarter) med repellent- och deterrentverkan på smågnagare.

Ett arbete inom detta område skulle kunna inledas med att i tvåvalskammare laborativt pröva signifikansen av dessa uppgifter.

Genom insatser från NFR:s ekologikommitté och Nordiska rådet för terrestrisk ekologi har en nordisk grupp av smågnagareforskare bildats (Nordmus). En rad artiklar i NFR:s ekologibullentin nr 19, Biocontrol of rodents (222) ger en

överblick av vad man för närvarande vet om skadornas bakgrund och omfattning inom jordbruk och skogsbruk samt även de hittills ganska fruktlösa försöken att begränsa skadornas omfattning. Rapporten utmynnar i en analys av möjligheterna att utveckla en biokontroll av smågnagare. En av de möjligheter som framhålls är användandet av naturliga växtsubstanser med repellentverkan.

Växternas sekundära substanser påverkar även andra växtätande organismer än insekter. Växtätande däggdjur är t ex kapabla att i viss utsträckning avgifta och eliminera sekundära växtsubstanser. Detoxifieringsmekanismernas kapacitet begränsar näringsurvalet. Växtätare med det största "ätregistret" har förmåga att: 1) behandla nya födoämnen med yttersta försiktighet, 2) snabbt lära sig att äta eller förkasta en viss föda, 3) söka upp och äta växter som innehåller vissa specifika näringsämnen, 4) bygga sin diet på ett begränsat antal stapelarter samtidigt som en kontinuerlig sampling av potentiella näringsväxter sker, 5) föredra välkänd föda, 6) föredra växter och växtdelar med låg halt av sekundära växtsubstanser (213).

Projektets anknytningsmöjligheter till den pågående forskningen beträffande snabbväxande energiskogar.

Med nämnden för Energiproduktionsforskning som övergripande organ arbetar projektgrupper med energiskogsforskningen inom följande områden:

- odling, skötsel och avverkning av snabbväxande skog
- markinventeringar
- transportsystem
- konvertering till bränslen och organiska bas-kemikalier
- systemanalyser

Enligt vår bedömning skulle vårt projekt kunna bidra till energiskogsforskningen under den i SNV:s forskningsprogram prioriterade rubriken "hälso- och miljöeffekter av nya energikällor" genom att med den utvecklade läcko- och såro-

gramtekniken kartlägga de aktuella växtarternas allelokemiska produktion så att man inte i dessa nya monokulturer bäddar för massangrepp genom försvarskemisk utarmning.

13.3 Antimikrobiella ämnen från högre växter

Tyngdpunkten i jakten på antimikrobiella ämnen som fram till nu gett över 2000 antibiotika (224) förskjuts alltmer från mikroorganismerna till de högre växterna. Det förtjänar att påpekas att växternas försvar mot mikroorganismer utformats efter samma principer som försvaret mot växtätare. I många fall är det samma substanser som är verksamma. Projektets organisatoriska anslutning till en medicinsk institution underlättar en framtida test av de identifierade allelokemikalierna ur denna synpunkt.

13.4 Miljökonsekvenser av växternas allelokemikalier

En kontroll av skadegörare med hjälp av växternas allelokemikalier är en ekologisk kontroll i den meningen att den verkar ekologiskt riktigt genom att inte i första hand döda skadegörarna utan genom att avvisa dem från människans monokulturer och hänvisa dem att anpassa sitt individantal efter tillgången på vilda värdväxter. Även om en hel del av växternas försvarssubstanser är toxiska är det fråga om substanser som under lång tid funnits i ekosystemet och som deltar i de naturliga kretsloppen. Det inbyggda kemiska självförsvaret som bör utgöra grunden för kulturväxternas försvar medför ju inte några nya tillskott till de organiska ämnen som i kretsloppen befinner sig utanför biomassan. Även i de fall det är nödvändigt att förstärka en växts försvar mot allelokemikalier som härstammar från andra växter bör det finnas goda möjligheter att finna ekologiskt acceptabla sätt för applicering av dessa preparat som på grund av sitt ursprung och de låga tröskelvärdena har avgörande fördelar framför konventionella kemiska bekämpningsmedel. Pyrethrumpreparaten utgör, trots att de tillhör den toxiska sektorn av allelokemikalier, ett gott exempel på

dessa ämnens användningsmöjligheter som ytterligare förstärks av de vidsträckta möjligheterna att framställa derivat (225).

Trots de redovisade fördelarna med naturliga allelokemikalier måste man hela tiden vara vaksam mot eventuella negativa miljökonsekvenser även av dessa ämnen. I USA har man i de nya bestämmelserna från Food och Drug Administration skrivit in krav på kemisk forskning för att dokumentera att de kemiska förändringar som sker i växten vid resistensförädling inte innebär hälsorisker eller risker för felnäring för människor och djur som konsumerar den förädlade grödan. I Sverige har i den pågående debatten om våra matvanor följande fråga ställts: Varför underkastas inte de kemiska beståndsdelarna i de livsmedel, som vi ständigt äter, samma minutiös kontroll, som de läkemedel vi förtär sällan eller i ringa mängd? Även inom detta område har enligt vår bedömning den forskning som detta projekt företräder en betydelsefull uppgift.

13.5 Förbättring av de tekniska möjligheterna till tolkning av växternas försvarskemi

Vi har tidigare påpekat vikten av att kartlägga det mycket stora antal komponenter som avges till omgivningen av varje växt. Gaskromatografin ger möjlighet till en separation av denna komplexa blandning genom att man varierar kolonnmaterialet. Ibland är separationen mellan två komponenter otillräcklig vilket medför tolkningssvårigheter vid registreringen av dessa komponenters masspektrum. En annan svårighet är hanterandet av den väldiga mängd masspektra (upp till 1000) som kan erhållas vid varje körning av en komplex blandning från ett växtobjekt. Dessa svårigheter kan minskas genom direktkoppling mellan GC-MS instrumenteringen och en mindre dator. Det finns numera programvara som direkt styr masspektrometern för repetitiva scan och registrerar, normaliserar och sorterar ut komponenternas masspektra bl a genom rekonstruktion av gaskromatogrammet och eventuell

icke separerade fraktioner. Ytterligare ett stort antal masspektra uppkommer genom behovet att ta stickprov av växts produktion av flyktiga försvarssubstanser under olika tider på dygnet samt vid olika temperaturer.

SLUTORD

Professor Bertil Kullenberg och de framlidna professorerna Stina och Einar Stenhagens tvärvetenskapliga pionjärarbete inom området kemiskt styrt insektsbeteende och metodutveckling för känslig analys av flyktiga föreningar har skapat förutsättningar för detta projekt. Vi är dem stort tack skyldiga för att de på olika sätt stött och uppmuntrat vårt arbete.

Vi tackar också våra medarbetare Maja Rydholm och Elsa Ask för intresserat och tålmodigt arbete med beteendeförsök och tidsödande insektsodlingar.

Ann Pagot tackas varmt för de sekreterarinsatser hon gjort för projektet även utöver de arbetsuppgifter som åligger henne i tjänsten.

Greta Norelius har visat stort tålamod när det gäller att korrigera vår engelska text vid detta och tidigare tillfällen.

Denna undersökning bekostas av Statens naturvårdsverk. Värdefullt ekonomiskt stöd har också erhållits av Knut och Alice Wallenbergs stiftelse, vilken bl a finansierat den laboratoriebyggnad där arbetet bedrivs. Anslag från Ekhagastiftelsen under inledningsskedet möjliggjorde igångsättandet av projektet. Ett värdefullt stöd har även varit de resurser inom Avdelningen för Strukturkemi som vi fått använda genom professor Sixten Abrahamssons försorg

LITTERATURFÖRTECKNING

1. Rothschild, M.,

Remarks on carotenoids in the evolution of signals. - In Gilbert, G.E. & Raven, P.H. (Eds.), Coevolution of Animals and Plants, University of Texas Press, 1975, 20-50.

2. Rothschild, M.,

Secondary plant substances and warning coloration in insects. - In van Emden, H.F. (Ed.), Insect/Plant Relationships. Blackwell Scientific Publications, 1973, 59-83.

3. Dethier, V.G.,

Chemical Insect Attractants and Repellents. Blakinston Co., Philadelphia, 1947.

4. Brower, I.P. & Brower, J. van Z.,

Birds, butterflies and plant poisons: a study in ecological chemistry. - Zoologica, 49, 137-159 (1964).

5. Dethier, V.G.,

Evolution of feeding preferences in phytophageous insects.- Evolution, 8, 33-54 (1954).

6. Ehrlich, P.R. & Raven, P.H.,

Butterflies and plants: a study in coevolution. - Evolution, 18, 586-608 (1964).

7. Ehrlich, P.R. & Raven, H.R.,

Butterflies and plants. - Scientific American, 216:6, 104-113 (1967).

8. Atsatt, R.A. & O`Dowd, D.J.,

Plant defence guilds. - Science, 193, 24-29 (1976).

9. Clayton, R.B.,

The chemistry of nonhormonal interactions: Terpenoid compounds in ecology. - In Sondheimer, E, & Simeone, J.B. (Eds.), Chemical Ecology, Academic Press, New York, 1970, 235-280.

10 Erickson, J.M. & Feeny, P.,

Sinigrin: A chemical barrier to the black Swallowtail butterfly (Papilio polyxenes). - Ecology 55, 103-111 (1974).

11. Feeny, P.,

Seasonal changes in oak leaf tannins and nutritients as a course of spring feeding by winter moth caterpillars. - Ecology, 51, 4, 565-581 (1970).

12. Jones, D.A.,

Cyanogenic glycosides and their function. - In Harborne, J.B. (Ed.) Phytochemical Ecology, Phytochemical Society Symposia, Series 8, 1972, 103-122.

13. Rehr, S.S., Janzen, D.H. & Feeny, P.,

L-Dopa in Legume Seeds: A chemical barrier to insect attack. - Science, 181, 81-82 (1973.

14. Williams, C.M.,

Third-Generation pesticides. - Scientific American, 217, 1, 13-17 (1967).

15. Whittaker, R.H.,

The biochemical ecology of higher plants. - In Sondheimer, E. & Simeone, J.B (Eds.), Chemical Ecology, Academic Press, New York, 1970, 43-70.

16. Brown, W.L., Eisner, Th. & Whittaker, R.H.,

Allomones and kairomones: Transspecific chemical messengers. - Bioscience, 20: 1, 21:22 (1970).

17. The designation of chemicals in terms of the responses thej elicit from insects. - Journal of Economic Entomology, 53: 1, 134-136 (1960).

18. Beck, S.D.,

Resistance of plants to insects. - Annual Review of Entomology, 10, 207-232 (1965).

19. Lindstedt, K.J.,

Chemical control of feeding behaviour. - Comparative Biochemistry and Physiology, 39 A, 553-581 (1971).

20. Rice, E.L.,

Allelopathy, Academic Press, New York, 1974, 1-22.

21. Harborne, J.B.,

Introduction to Ecological Biochemistry, Academic Press, London, 1977, 178-231.

22. Dethier, V.G.,

Chemical interactions between plants and insects. - In Sondheimer E. & Simeone, J.B. (Eds.), Chemical Ecology, Academic Press, New York, 1970, 83-102.

23. Dethier, V.G.,

Chemical interactions between plants and insects.- In Sondheimer, E. & Simeone, J.B. (Eds.), Chemical Ecology, Academic Press, New York, 1972, 83-102.

24. Meuse, A.D.,

Co-evolution of plant hosts and their parasites as a taxonomic tool. - In Heywood, V.H. (Ed.), Taxonomie and Ecology, Academic Press, London, 1973, 289-316.

25. Cates, R.G.,

The interface between slugs and wild ginger: Some evolutionary aspects. - Ecology, 56, 391-400 (1975)

26. Cates, R.G. & Orians, C.H.,

Successional status and the palatability of plants to generalized herbivores. - Ecology, 56, 410-418 (1975).

27. Janzen, D.H.,

Community structure of secondary sompounds in plants. - Pure and Applied Chemistry, 34, 529-538 (1973).

28. Root, R.B.,

Organization of a plant-arthropod association in simple and diverse habitats: The fauna of collards (Brassica oleracea). - Ecological Monographs, 43, 95-124 (1973).

29. Swain, T.,

Biochemical evolution in plants. - Comprehensive Biochemistry 29 A, .25-302(1974).

30. Janzen, D.H.,

Tropical blackwater rivers, animals and mast fruiting by the Dipterocarpaceae. - Biotropica, 6:2, 69-103 (1974)

31. Root, R.B.,

Some consequenses of ecosystem texture. - In Levin, S.A. (Ed.), Ecosystem Analysis and Prediction, 1975, 3-19.

32. Feeny, P.,

Biochemical coevolution between plants and their insect herbivores. - In Gilbert, L.E. & Raven, P.H. (Eds.), Coevolution of Animals and Plants, University of Texas Press, Austin and London, 1975, 3-19.

33. Futuyama, D.J.,

Food plant specialization and environmental predictability in Lepidoptera. - American Naturalist, 110: 972, 285-292 (1976).

34. Feeny, P.,

Biochemical co-evolution between plants and their insect herbivores. - In Gilbert, L.E. & Raven, P.H. (Eds.), Coevolution of Animals and Plants, University Texas Press, Austin, 1975, 3-19.

35. Feeny, P.,

Plant apparency and chemical defense. - In Wallace, J.W. & Mansell, R.L. (Eds.), Biochemical Interactions Between Plants and Insects, Plenum Press, New York and London, 1976, 1-37.

36. Rhoades, D.F. & Cates, R.G.,

Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. - In Wallace, J.W. & Mansell, R.L. (Eds.), Biochemical Interaction Between Plants and Insects, Plenum Press, New York and London, 1976, 168-213.

37. Lundgren, L. & Bergström, G.,

Citral in the andraconial secretion of Pieris egane. - accepterad för publ. Biochemical Systematics and Ecology, (1978).

38. Tahvanainen, J.O. & Root, R.B.,

The influence of vegetational diversity on the population ecology of a specialized herbivore, Phyllotreta cruciferae (Coleoptera:Chrysomelidae). - Oecologica, 10, 321-346 (1972).

39. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. - Ecology, 51, 565-581 (1970).

40. Rhodes, D.F.,

The anti-herbivore defences of Larrea. - In Mabry, T.J. & Hunziker, J. & DiFeo Jr, D.R. (Eds.) 1977.

41. Crisp, P.,

Trends in breeding and cultivation of cuciferous crops. - In Vaughan, J.G., MacLeod, A.J. & Jones, B.M.G. (Eds.), The Biology and Chemistry of the Cruciferae, Academic Press, London, 1976, 67-118.

42. Kjaer, A.,

Glucosinalates in the Cruciferae. - In Vaughan, J.G., MacLeod, A.J. & Jones, B.M.G. (Eds.), The biology and Chemistry of the Cruciferae, Academic Press, London, 1976, 207-219.

43. Beck, S.D.,

Theoretical aspects of hos plant specificity in insects. - In Maxwell, F.G. & Harris, F.A. (Eds.) Proceedings of the Summer Institute on Biological Control of Plant Insects and Diseases, 1974, 290-311.

44. Day, P.R.,

Genetics of Host-parasite Interactions, Freeman, San Fransisco, 1974, 11-17.

45. Chapman, R.F.,

The chemical inhibition of feeding by phytophagous insects: a review. - Bulletin of Entomology Research, 64,339-363 (1974).

46. Hedin, P.A., Maxwell, F.G. & Jenkins, J.N.,

Insect plant attractants, feeding stimulants, repellents, deterrents, and other releated factors affecting insect behaviour. - In Maxwell, F.G. & Harris, F.A. (Eds.). Proceedings of the Summer Institute on Biological Control of Plant Insects and Diseases, 1974, 494-527.

47. Applebaum, S.W., Gestetner, B. & Birk, Y.,

Physiological aspects of host specificity in the Bruchidae. IV Developmental incompatibility of soybeans for Callosobruchus. - Journal of Insect Physiology, 11, 611-616 (1965).

48. Rabb, R.L., Stinner, R.E. & Carlson, G.A.,

Ecological principles as a basis for pest management in the agroecosystem. - In Maxwell, F.G. & Harris, F.A. (Eds.), Proceedings of the Summer Institute on Biological Control of Plant Insexts and Diseases, 1974, 19-45.

49. Maxwell, F.G.,

Host-plant resistance to insects-chemical relationships. - In Shorey, H.H. & Mc Kelvey, J.J.Jr (Eds.) - Chemical Control of Insect Behaviour: Theory and Application, 1977, 299-304.

50. Hagberg, A.,

Växtförädling grön evolution. Natur och Kultur, Stockholm, 1977.

51. Jaques, R.P.,

Pieris rapae (L), imported cabbageworm (Lepidoptera: Pieradae) and Plutella maculipennis (Curtis), diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae).- Commonwealth Institute of Biology, Contr Techn Comm., 4, 30-31 (1971).

52. Gardiner, B.O.C.,

Pieris brassicae L. established in Chile; another palearctic pest crosses the Atlantic (Pieridae). - Journal of the Lepidopterists' Society, 28: 3, 269-277 (1974).

53. Ma, W.C.,

Dynamics of feeding responses in Pieris brassicae L. as a function of chemosensory input: A behavioural, ultrastructural and electrophysiological study. - Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen, Nederland 200, 72-11 (1972).

54. Lundgren, L.,

Natural plant chemicals acting as oviposition deterrents on cabbage butterflies (Pieris brassicae)L. and P. napi L.- Zoologica Scripta, 4, 253-258 (1975).

55. Hurpin, B.,

L'Insectarium de la Miniére. - Annales de L'Institute National de la Recherche Agronomique. Série C. Annales des Epihyties, 11:3, 423-432 (1960).

56. Tanada, Y.,

Description and characteristics of a granulosis virus of the imported cabbageworm. - Proceeding of the Hawaiian Entomological Society, 15:1, 235-260 (1953).

57. David, W.A.L. & Gardiner, B.O.C.,

Rearing Pieris brassicae L. on semi-synthetic diets with and without cabbage. - Bulletin of Entomological Research, 56, 581-593 (1965).

58. David, W. & Gardiner, B.,

Rearing Pieris brassicae L. larvae on a semi-synthetic diet. - Nature, 207: 4999, 882-883 (1965).

59. Bottger, G.T.,

Development of synthetic food media for use in nutrition studies of the European corn borer. - Journal of Agriculture Research, 65: 10, 493-500 (1942).

60. Beckman, H.F., Bruckart, S.M. & Reiser, R.,

Laboratory culture of the pink bollworm on chemically defined media. - Journal of Economic Entomology, 46: 4, 627-630 (1953).

61. Vanderzant, E. & Reiser, R.,

Studies of the nutrition of the pink bollworm using purified casein media. - Journal of Economic Entomology, 49: 1, 454-458 (1956).

62. Vanderzant, E. & Reiser, R.,

Aseptic rearing of the pink bollworm on synthetic media. - Journal of Economic Entomology, 49: 1, 7-10 (1956).

63 a. Ma, W.C. & Schoonhoven, L.M.,

Tarsal contact chemocensory hairs of the large white butterfly (Pieris brassicae) and their possible role in oviposition behaviour.- Ent. exp. & Applicata 16, 343-357 (1973).

63 b. Ignoffo, C.M.,

A successful technique for massrearing cabbage loopers on a semisynthetic diet. - Annals of the Entomological Society of America, 56, 178-182 (1963).

64. Riddiford, L.M.,

Artificial diet for Cecropia and other Saturniid silkworms. - Science, 160, 1461-1462 (1968).

65. Junnikkala, E.,

Effect of a semi-synthetic diet on the level of the main nitrogenous compounds in the hemolymph of larvae of P. brassicae L. - Annales Academiae Scientarium Fennicae A: IV, Biologica (Helsinki) 155, 1-10 (1969)

66. David, W. & Gardiner, B.,

Rearing Mamestra brassicae L. on semi-synthetic diets. - Bulletin of Entomological Research, 57, 1, 137-142 (1966).

67. Grison, P. & Silvestre de Sacy, R.,

L'Elevage de Pieris brassicae L. Pour les essais de traitements microbiologiques. - Annales de Epiphyties, IV, 661-674 (1956).

68. Lundgren, L. & Bergström, G.,

Wing scents and scentireleased phases in the courtship behaviour of Lycaeides argyrognomon (Lep. Lycaenidae) - Journal of Chemical Ecology, I:4, 399-412 (1975).

69. Malicky, H.,

Uebersicht über Präimaginalstadien, Bionomie und Ökologie der Mitteleuropäischen Lycaenidae. - Mitteilungen der Entomologischen Gesellschaft, Basel, 19: 2-3, 25-91 (1969).

70. Sohm-Ekbom, B.,

A method for rearing Agrotus (Scotia) segetum Schiff. and Agrotis (Scotia) exclamationis L. (Lep. Noctuidae) on an artificial diet. - Entomologisk Tidskrift, 98: 3, 103-106 (1977).

71. Wiklund, Ch.,

Inomhusodling av Makaonfjärilen. - Zoologisk Revy, 33: 1-2, 35-42 (1971).

72. Mothes, K.,

Secondary plant substances as materials for chemical high quality breeding in higher plants. - In Wallace, J.W. & Mansell, R.L. (Eds.). Recent Advantages in Phytochemistry. Biochemical Interaction Between Plants and Insects, Plenum Press, London, 1975, 10: 385-405.

73. Ettlinger, M.G. & Kjaer, A.,

In Mabry, T.J. Runockles, V.C. & Alston, R.E., Recent Advances in Phytochemistry, Appleton-Century-Crofts, New York, 1968, 1:59-144.

74. Jones, D.A.,

Cyanogenic glucosides and their function. - In Harborne, J.B. (Ed.) Phytochemical Ecology, Phytochemical Society Symposia, 8, 1972.

75. Stein, W.D.,

The Movement of Molecules across Cell Membranes, Academic Press, 1967.

76. Folch, J., Lees, M. & Stanley, G.H.,

A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. - Journal of Biological Chemistry, 226, 497-509 (1957).

77. Terofal, P.,

Zum Problem der Wirtsspecifität bei Pieriden. - Mitteilungen der Münchener Entomologischen Gesellschaft, 55, 1-76 (L965).

78. Dethier, V.G.,

Host plant perception in phytophageous insects.- Trans. 9th International Congress in Entomology Amsterdam 2, 81-88 (1951).

79. Munakata, K.,

Insect feeding deterrents in plants. - In Shorey, H. H. & McKelvey Jr, J.J. (Eds.), Chemical Control of Insect Behaviour: Theory and Application, 1977, 93-100.

80. Gary, N.E.,

Pheromones that affect the behaviour and physiology of honeybees. - In Birch, L.E. (Ed.), Pheromones, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1974, 200-221.

81. Dravnieks, A.,

Instrumental Aspects of Olfactometry. - In Moulton, D.G., Turk, A. & Johnston Jr, J.W., (Eds.) Methods in Olfactory Research, Academic Press, London, 1975, 1-61.

82. Poucher, W.A.,

Perfumes, Cosmetics and Soaps, Chapman and Hall, London, 1959, 78.

83. Daterman, G.E. & McComb, D.,

Female sex attractant for survey trapping European pine shoot moth. - Journal of Economical Entomology 63:5, 1406-1409 (1970).

84. Hardee, D.D., McKibben, G.H., Gueldner, R.C., Mitchell, E.B., Tumlinson, J.H. & Cross, W.H.,

Boll weevils in nature repond to Grandlure a synthetic pheromone. - Journal of Economic Etmonology 65 :1, 97-100 (1972).

85. Debolt, J.W.,

Dispensers for baiting traps ezqipped with blacklight lamps with synthetic sex pheromone of the female cabbage looper. - Journal of Economic Entomology 63:1, 141-144 (1970).

86. Cone, W.W., McDonough. L.M., Maitlen, J.C. & Burdajewicz, S.,

Pheromone studies of the twospotted spider mite. In Evidence of a sex pheromone. - Journal of Economic Entomology 64:2, 355-358 (1971).

87. Brady, U.E., Tumlinson, J.H., Brownlee, R.G. & Silverstein, R.M.,

Sex stimulant and attractant in the Indian meal moth and in the almond moth. - Science, 171, 802 (1971).

88. Buttery, R.G., Seiffert, R.M., Guadagni, D.G. & Ling, L.C.,

Characterization of some volatile constituents of Bell Peppers. - Journal of Agricultural and Food Chemistry, 17, 1322-1327 (1969).

89. Weurman, C.,

Isolation and concentration of volatiles in food odor research. - Journal of Agricultural Food Chemistry, 17: 2, 370-383 (1969).

90. Chang, S.S.,

Overcoming problems in flavor components identification. - Food Technology, 27, 27-39 (1973).

91. Inscoe, M.N. & Beroza, M.,

Analyses of pheromones and other compounds controlling insect behaviour. - Analytical Methods of Plants Groth Regulation, 8, 69-70 (1976).

92. Vitzthum, O.G., Werkhoff, P. & Hubert, P.,

Volatile components of roasted cocoa: Basic fraction. - Journal of Food Science, 40, 911-916 (1975).

93. Nelson, P.E. & Hoff, J.E.,

Paraffin oil for extraction & collection of volatile microconstituents in food. - Food Technology, 22, 61-64 (1968).

94. Hachenberg, H. & Schmidt, A.P.,

Gas Chromatographic Headspace Analysis. Heyden, London, 1977.

95. Rasmussen, R.A. & Went, F.W.,

Volatile organic material of plant origin in the atmosphere. -Proceedings of the National Academy of Science, USA, 53, 215-220 (1965).

96. Dimitriades, B. & Seizinger, D.E.,

A procedure for routine use in chromatographic analysis of automotive hydrocarbon emissions. - Environmental Science & Technology, 5: 3, 223-229 (1971).

97. Morgan, E.D. & Wadhams, L.J.,

Gas chromatography of volatile in small samples of biological material. - Journal of Chromatographic Science, 10, 528-529 (1972).

98. Ställberg-Stenhagen, S., Stenhagen, E. & Bergström G.,

Analytical techniques in pheromone studies. - Zoon, 1, 77-82 (1973).

99. Heins, J.Th., Maarse, H., ten Noever de Brauw, M.C. & Weurman, C.,

Direct food vapour analysis and component identification by a coupled capillary GLC-MS arrangement. - Journal of Gas Chromatography, 395-397 (1966).

100. Farrington, P.S., Pecsok, R.L., Meeker, B.L. & Olson, T.J.,

Detection of trace constituents by gas chromatography. - Analytical Chemistry, 31:9, 1512-1516 (1959.

101. Tyson, B.J. & Carle, G.C.,

Gas chromatographic separation of water from cryogenically collected air samples - enhanched concentration of trace organic volatiles prior to GC-MS analyses. - Analytical Chemistry, 46: 4, 610-613 (1974).

102. Thompson, A.C., Baker, D.N., Gueldner, R.C., Hedin, P.A.,

Identification and quantitative analyses of the volatile substances emitted by maturing cotton in the field. - Plant Physiology, 48, 50-52 (1971).

103. Dement, W.A., Tyson, B.J. & Mooney, H.A.,

Mechanism of monoterpene volatilization in Salvia mellifera.- Phytochemistry, 14: 12, 2555-2557 (1975).

104. Browne, L.E., Birch, M.C. & Wood, D.L.,

Novel trapping and delivery systems for airborne insect pheromones. - Journal of Insect Physiology, 20, 183-193 (1974).

105. Lueb, R.A., Ehhalt, D.H. & Heidt, L.E.,

Balloon-borne low temperature air sampler. - Review of Scientific Instruments, 46:6, 702-705 (1975).

106. Bartle, K.D., Bergstedt, L., Novotny, M. & Widmark,G.

Tobacco chemistry. II. Analysis of the gas phase of tobacco smoke by gas chromatography - mass spectrometry. - Journal of Chromatography, 45, 256-263 (1969).

107. Grob, K. & Grob, G.,

Trace analyses on capillary columns. Selected practical applications: Insecticides in raw butter extract, aroma head space from liquors. Auto exhaust gas. - Journal of Chromatographic Science 8, 635-639 (1970).

108. Schultz, T.H., Flath, R.A. & Mon, T.R.,

Analyses of orange volatile with vapour sampling. - Journal of Agricultural and Food Chemistry, 19:6, 1060-1065 (1971)

109. von Sydow, E., Andersson, J., Anjou, K., Karlsson, G., Land, D. & Griffiths, N.,

The aroma of bilberries (Vaccinium myrtillus)L. II. Evaluation of the press juice by sensory methods and by gas chromatography and mass spectrometry. - Lebensm. - Wiss u. Technol., 3, 11-17 (1970).

110. Bergert, K.H. & Betz, V.,

Erfahrungen bei der Quantitativen Analyse von flüchtigen organischen Mikroverunreinigungen in Luft. - Chromatographia, 7:12, 681-687 (1974).

111. Shapiro, J.,

Analytical Chemistry, 39, 280 (1967).

112. Bidmead, D.S.,

In Recent Advances in Food Sciences, Butterworth, London, 1963, 158.

113. Claesson, S.,

Arkiv för kemi och Mineralogi, 23, 55 (1946/47).

114. Turk, A., Morrow, J.I. & Kaplan, B.E.,

Olefin isomerization in adsorptive sampling on activated carbon. - Analytical Chemistry, 34:4, 561-564 (1962).

115. Grob, K. & Grob, G.,

Gas-liquid chromatographic-mass spectrometric investigation of C_6 - C_{20} organic compounds in an urban atmosphere. - Journal of Chromatography 62, 1 - 13 (1971)

116. Dhont, J.H. & Weurman, C.,

The isolation and determination of volatile compounds by adsorption on Charcoal. - Analyst 85, 419-422 (1960).

117. Raymond, A. & Cuiochon, G.,

The use of graphitized carbon black as a trapping material for organic compounds in light gases before a gas chromatographic analyses. - Journal of Chromatographic Science 13:4, 173-177 (1975).

118. Raymond, A. & Guiochon, G.,

Gas chromatographic analyses of C_8 - C_{18} hydrocarbons in Paris air. - Environmental Science & Technology, 8:2, 143-148 (1974).

119. Bruner, F., Cicciolo, P. & Di Nardo, F.,

Use of graphitized carbon black in environmental analyses. - Journal of Chromatography 99, 661-672 (1974)

120. Ogata, M., Asahara, H. & Saeki, T.,

Sampling and analyses of some aromatic aliphatic and chlorinated hydrocarbon vapours in air, a gas-liquid chromatographic and coloritmetic method. - Int. Arch. Arbeitsmedizin 34, 25-37 (1975).

121. Altschuller, A.P., Bellar, T.A. & Clemons, C.A.,

American industrial hygien association. - Journal 23, 164 (1962).

122. Ixfeld, H. & Buck, M.,

Eine Methode zur Bestimmung der Gesamtmenge verbrennbarer organischer Substanzen in Abgasen. - Brennstoff-Chemie 47, 79 (1966).

123. Yule, W.N., Cole, A.T. & Hoffman, I.,

A survey for atmosphere contamination following forest spraying with fenitrothion. - Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology, 16:4, 289-296 (1971).

124. Mc Ewen, D.J.,

Automobil exhaust hydrocarbon analyses by gas cromatography. - Analytical Chemistry, 38:8, 1047-1053 (1966).

125. Tunstall, J.P.,

Sex attractant studies in Diparopsis. - Pest Articles and New Summaries 11:2, 212-214 (1965).

126 a. Eggertsen, F.J. & Nelsen, F.M.,

Gas chromatographic analyses of engine exhaust and atmosphere. Determination of C_2 to C_5 Hydrocarbons. - Analytical Chemistry 30:6, 1040-1043 (1958).

126 b. Carlstrom, A.A., Spencer, C.F. & Johnson, J.F.,

Determination on trace water in butane by gas chromatography. - Analytical Chemistry 32, 1056 (1960).

127. Schneider, C.R. & Freund, H.,

Determination of low level hydrocyanic acid in solution using gas-liquid chromatography. - Analytical Chemistry 34:1, 69-74 (1962).

128. Cropper, F.R. & Kaminsky, S.,

Determination of toxic organic compounds in admixture in the atmosphere by gas chromatography. - Analytical Chemistry 35:6, 735-743 (1963).

129. Colson, E.,

A partition sampler for vapour analyses by gas chromatography. - Analytical Chemistry 35:8, 1111-1112 (1963).

130. Bellar, T.A., Brown, M.F. & Sigsby, J.E.,

Determination of atmospheric pollutants in the part-per-billion range by gas chromatography - A simple trapping system for use with flame zonization detectors - Analytical Chemistry 35:12, 1924-1927 (1963).

131. Novák, J., Vasak, V. & Janák, J.,

Chromatographic method for the concentration of trace impurities in the atmosphere and other gases. - Analytical Chemistry 37:6, 660-666 (1965).

132. Williams, J.H.,

Gas chromatographic techniques for the identification of low concentrations of atmospheric pullutants. - Analytical Chemistry 37:13, 1723-1732 (1965).

133. Fallentin, B.,

Gaskromatografisk bestemmelse af luftforureninger.- Dansk Kemi 46:9, 133-136 (1965).

134. Silverstein, R.M. & Rodin, J.O.,

Insect pheromone collection with absorbtion columns: I: Studies on model organic compounds. - Journal of Economic Entomology, 59:5, 1152-1154 (1966).

135. Dravnieks, A.,

Odours as signatures - New Scientist 31:9, 622-624 (1966).

136. Dravnieks, A., & Krotoszynski, B.K.,

Collection and processing of airborne chemical information. - Journal of Gas Chromatography, 4, 367-370 (1966).

137. Andersson, C.O., Bergström, G., Kullenberg, B. & Ställberg-Stenhagen, S.,

Studies on natural odouriferous compounds. I. Identification of macrocyclic lactones as odouriferous components of the scent of the solitary bees, Halictus calceatus Scop and Halictus albipes F. - Arkiv för Kemi 26:17, 191-198 (1966).

138. Stephens, E.R. & Burleson, F.R.,

Analysis of the atmosphere for light hydrocarbons.- Journal of the Air Pollution Control Association 17:3, 147-153 (1967).

139. Selucky, M., Novák, J. & Janák, J.,

The use of the chromatographic equilibration procedure for air pollution studies. Determination of minute amounts of benzene, chlorobenzene and nitrobenzene in air. - Journal of Chromatography, 28, 285-292 (1967).

140. Kubeczka, K.-H.,

Vorrichtung zur Isolierung, Anreicherung und chemischen Charakterisierung gaschromatographisch getrennter Komponenten im ug-Bereich. - Journal of Chromatography 31, 319-325 (1967).

141. Tumlinson, J.H., Hardee, D.D., Miniyard, J.P., Thmopson, A.C., Gast, R.T. & Hedin, P.A.,

Boll weevil sex attractants: isolation studies. - Journal of Economic Entomology 61:2, 470-474 (1968).

142. Zocchi, F.,

Gas chromatographic analysis of hydrocarbons in methane in the part per billion range. - Journal of Gas Chromatography 6, 100-102 (1968).

143. Dravnieks, A. & Krotoszynski, B.K.,

Collection and processing of airborne chemical information II. - Journal of Gas Chromatography 6, 144-149 (1968).

144. Röller, H., Biemann, K., Bjerke, J.S., Norgard, D.W. & Shan, W.H.,

Sex pheromones of pyralid moths - I. Isolation and identification of the sex-attractant of Galleria mellonella L.(greater wax moth). - Acta entomologica bohemoslovakia 65, 208-211 (1968).

145. Risebrough, R.W., Huggett, R.J., Griffin, J.J. & Goldberg, E.D.,

Pesticides: Transatlantic movements in the northeast trades. - Science 159:3, 1233-1236 (1968).

146. Cantuti, V. & Cartoni, G.P.,

The gas chromatographic detection of tetraethyllead in air. - Journal of Chromatography 32, 641-647 (1968)

147. Regnier, F.E. & Wilson, E.O.,

The alarm-defence system of the ant Acanthomyops claviger. - Journal of Insect Physilogy 14, 955-970 (1968).

148. Brady, U.E. & Smithwick, E.B.,

Production and release of sex attractant by the female indian-meal moth Plodia interpunctella. - Annals of the Entomological Society of America 61:5, 1260-1265 (1968).

149. Bellar, T.A. & Sigsby Jr, J.E.,

Direct gas chromatographic analysis of low molecular weight substituted organic compounds in emissions. - Environmental Science & Technology 4:2, 150-156 (1970).

150. Tessari, J.D. & Spencer, D.L.,

Air sampling for pesticides in the human environment. - Journal of the AOAC 54:6, 1376-1382 (1971).

151. Hess, E. & Lutz, H.,

Die Geruchsaffinität der Milch nachgewiesen am Modell eines fettlöslichen radioaktiv markierten Geruchstoffes. - Alimenta 3, 95-101 (1971).

152. Altschuller, A.P., Lonneman, W.A., Sutterfield, F.D. & Kopczynski, S.L.,

Hydrocarbon composition of the atmosphere of the Los Angeles basin - 1967. - Environmental Science & Tecnology 5:10, 1009-1019 (1971).

153. Gelbičová- Ružičova, J., Novák, J. & Janák, J.,

Application of the method of chromatographic equilibration to air pollution studies. The determination of minute amounts of halothane in the atmosphere of an operating theatre. - Journal of Chromatography 64, 15-23 (1972).

154. Södergren, A.,

Chlorinated hydrocarbon residues in airborne fallout. - Nature 236, 395-397 (1972).

155. Buttery, R.G., Guadagni, D.G. & Ling, L.C.,

Flavor components: Volatilies invegetable oil and oil-water mixtures. Estimation of odor thresholds. -Journal of Agricultural and Food Chemistry 21:2, 198-201 (1973).

156. Hawrysh, Z.J. & Stime, C.M.,

Absorption of volatile methyl ketones by a natural model system: Freeze-dried cream. - Journal of Food Science 38, 7-10 (1973).

157. Brockhaus, A.,

Sampling of tetracyclic aromatic hydrocarbons under atmospheric conditions. - Athmospheric Environment 8, 521 (1973).

158. Holman, R.T. & Heimermann, W.H.,

Identification of components of orchid flagrances by gas chromatography - mass spectrometry. - American Orchid Society Bulletin, 42, 678-682 (1973).

159. Kaiser, R.E.,

Enriching volatile compounds by a temperature gradient tube. - Analytical Chemistry 45:6, 965-967 (1973).

160. Bergström, G.

Studies on natural odoriferous compounds. VI Use of a pre-column tube for the quantitative isolation of natural volatile compounds for gas chromatography /mass spectrometry. - Chemica Scripta 4, 135-138 (1973).

161. Kessler, K.,

Sorption von Aromastoffen an Lipide. - Dissertation Fachbereich Biochemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goehte-Universität, Frankfurt am Main 1974.

162. Angerer, J. & Haag, A.,

Zur Luftanalyse im Ultraspurbereich-Untersuchungen zur praktischen Verwendung der Kombination Thermogradientrohr-Gaschromatograph-Massenspektrometer. - Zeitschrift für Klinische Chemie und Kliniche Biochemie 12:7, 321-326 (1974).

163. Pellizzari, E.D., Bunch, J.E. & Carpenter, B.H.,

Collection and analysis of trace organic vapour-pollutants in ambient atmospheres. - Technique for evaluating concentration of vapours by sorbent media. - Environmental Science & Technology 9:6, 552-555 (1975).

164. Russel, J.W.,

Analysis of air pollutants using sampling tubes and gas chromatography. - Environmental Science & Technology 9, 1175-1178 (1975).

165. Ioffe, B.V., Vitenberg, A.G., Borisov, V.N. & Kuznetsov, M.A.,

Determination of trace impurities in gases by their equilibrium accumulation in volatile liquids. - Journal of Chromatography 112, 311-317 (1975).

166. Maier, H.G. & Kessler, K.,

Wechselwirkungen zwischen Aromastoffen und Lipiden 1. Mitteilung: Sorption einiger leichtflüchtiger Stoffe an reine Lipide. - Fette - Seifen - Anstrichmittel 79:6, 241-244 (1977).

167. Dravnieks, A, Krotoszynski, B.K., Whitfield, J., O´Donnell, A & Burgwald, T.,

High-speed coolection of organic vapours from the atmosphere. - Environmental Science & Technology 5, 1220-1222 (1971).

168. Aue, W.A. & Teli, P.M.

Sampling of air pollutants with support-bonded chromatographic phases. - Journal of Chromatography 62, 15-27 (1971).

169. Pellizzari, E.D., Carpenter, B.H. & Bunch, J.E.,

Collection and analysis of trace organic vapour pollutants in ambient atmospheres. - Environmental Science & Technology 9:6, 556-560 (1975).

170. Williams, F.W. & Umstead, M.E.,

Determination of trace contaminants in air by concentrating in porous beads. - Analytical Chemistry, 40:14, 2232-2234 (1968).

171. Loper, G.M., Flath, R.A. & Webster, J.L.,

Identification of ocimene in alfalfa flower aroma by combined GC-mass spectrometry. - Crop Science 11, 61-63 (1971).

172. Jennings, W.G., Wholeb, R. & Lewis, M.J.,

Gas chromatographic analysis of headspace volatile of alcoholic beverages. - Journal of Food Science 37, 69-71 (1972).

173. Krumperman, P.H.,

Erroneous Peaks from Porapak-Q Traps. - Journal of Agricultural and Food Chemistry 20:4, 909 (1972).

174. Frankel, L.S., Madsen, P.R., Siebert, R.R. & Wallisch, K.L.,

Selective retention by porous polymer adsorbents. Application to formaldehyd determination. - Analytical Chemistry, 44:14, 2401-2402 (1972).

175. Zlatkis, A., Lichtenstein, H.A. & Tishbee, A.,

Concentration and analysis of trace volatile organics in gases and biological fluids with a new solid adsorbent. - Chromatographica 6:2, 67-70 (1973).

176. Zlatkis, A., Bertsch, W., Lichtenstein, H.A., Tishbee, A, Shunbo, F., Liebich, H.M., Coscia, A.M. & Fleicher, N.,

Profile of volatile metabolites in urine by gas chromatography - mass spectrometry. - Analytical Spectrometry 45:4, 67-70 (1973).

177. Perry, R. & Twibell, J.D.,

A time based elution technique for the estimation of specific hydrocarbons in air. - Atmospheric Environment 7, 929-937 (1973).

178. Schnetzle, D., Crittenden, A.L. & Charlson, R.J.,

Application of computer controlled high resolution mass spectrometry to the analysis of air pollutants. - Journal of Air Pollution Control Accociation 23:8 704-709 (1973).

179. Mieure, J.P. & Dietrich, M.W.,

Determination of trace organics in air and water. - Journal of Chromatographic Science 11:11, 559-569 (1973).

180. Shadoff, L.A., Kallos, G.J. & Woods, J.S.,

Determination of bis (chloromethyl) ether in air by gas chromatography - mass spectrometry. - Analytical Chemistry 45:14, 2341-2344 (1973).

181. Thomas, T.C. & Seiber, J.N.,

Chromosorb 102, an efficient medium for trapping pesticides form air. - Bulletin of Environmental Contamination and Toxilogy 12, 17-25 (1974).

182. Perry, R. & Twibell, J.D.,

The collection and analysis of volatile hydrocarbon air pollutants using a timed elution chromatographic technique linked to a computer controlled mass spectremeter. - Biochemical Mass Spectrometry, 1, 73-77 (1974)

183. Gill, T.A. & Noble, A.C.,

A rapid and reproducible method for the collection and analysis of headspace volatiles. - Canadian Institute of Food Science and Technology Journal 7:1, 72-75 (1974).

184. Janák, J., Ružičova, J. & Novák, J.,

Effect of water vapour in the quantitation of trace components concentrated bu frontal gas chromatography on Tenax-GC. - Journal of Chromatography 99, 689-696 (1974).

185. Bertsch, W., Chang, R.C. & Zlatkis, A.,

The determination of organic volatiles in air pollution studies: Characterization of profiles. - Journal of Chromatographic Science 12:4, 175-182 (1974).

186. Novotny, M., Lee M.L. & Bartle, K.D.,

Some analytical aspects of the chromatographic headspace concentration method using a porous polymer. - Chromatographia 7:7, 333-338 (1974).

187. Sakodynskii, K., Panina, L. & Klimskaya, N.,

A studie of some properties of Tenax, a porous polymer sorbent. - Chromatographia 7:7, 339-344 (1974).

188. Vitzthum, O.G. & Werkhoff, P.,

Oxazoles and tiazoles in coffee aroma. - Journal of Food Science 39, 1210-1215 (1974).

189. Versino, B., de Groot, M. & Geiss, F.,

Air pollution - Sampling by adsorptioncolumns. - Chromatographia 7:6, 302-304 (1974).

190. Ellgehausen, D.,

Determination of volatile toxic substances in the air by means of a coupled gas chromatograph - mass spectrometer system - . Analytical Letters 8:1, 11-23 (1975).

191. Bunn, W.W., Deane, E.R., Klein, D.W. & Kleopfer, R.D.,

Sampling and characterization of Air for Organic Compounds. - Water, Air and Soil Pollution 4, 367-380 (1975).

192. Bourdin, M, Badré, R. & Duma, C.,

Prélèvement sur piège et analyse chromatographique des pollutants organiques légers de l´atmosphère. - Analusis 3:1, 34-38 (1975).

193. Liebich, H.M., Al-Babbili, O., Zlatkis, A. & Kim, K., Gas-chromatographic and mass-spectrometric detection of low molecular weight aliphatic alcohols in urine of normal individuals and patients with Diabetes Mellitus. - Clinical Chemistry 21, 1294-1296 (1975).

194. Parsons, J.S. & Mitzner, S.,

Gas chromatographic method for concentration and analysis of traces of industrial organic pollutants in environmental air and stacks. - Environmental Science & Technology 9:12, 1053-1058 (1975).

195. Butler, L.D. & Burke, M.F.,

Chromatographic characterization of porous polymers for use as adsorbents in sampling columns. - Journal of Chromatographic Science 14, 117-122 (1976).

196. Ligon Jr, W.V. & Johnson Jr, R.L.,

Divice for Thermally-Induced Vapour Phase Transfer of Adsorbed Organics Directly form an Adsorbent to a Gas Chromatograph - Mass Spectrometer. - Analytical Chemistry 48:3, 481-484 (1976).

197. Pellizzari, E.D., Bunch, J.E., Berkley, R.E., & McRae, J.,

Determination of trace hazardous organic vapour pollutants in ambient atmospheres by gas chromatography /mass spectrometry/computer. - Analytical Chemistry 48:6, 803, 807 (1976).

198. Neher, M.B. & Jones, P.W.,

In situ decomposition product isolated from Tenax GC while sampling stack gases. - Analytical Chemistry 49:3, 512-513 (1977).

199. Murray, K.E.,

The concentration of headspace, airborne and aqueous volatiles on Chromosorb 105 for examination by gas chromatography and gas chromatography - mass spectrometry. - Journal of Chromatography in press (1977).

200. Gudzinowicz, B.J., Gudzinovicz, M.J. & Martin, H.F.,

Fundamentals of Integrated GC-MS, del 1-3, Marcel Dekker, Inc New York (1976-1977).

201. Mc Fadden, W.H.,

Techniques of combined gas chromatography/mass spectrometry. Application in organic analysis, Wiley, New York (1973).

202. Hesso, A. & Räisänen, S.,

Aspects of high resolution glass capillary gas chromatography. - Research report, Prolab OY, Asematie 13 B SF-2700 Kauniainen, Finland.

203. Kirsten, W.J., Mattsson, P.E. & Alfons, H.,

Precolumn-capillary column gas chromatography for high resolution trace determinations in crude extracts. - Analytical Chemistry, 47:12, 1974-1979 (1975).

204. Henderson, W. & Steel, G.,

Total-effluent gas chromatography-mass spectrometry. - Analytical Chemistry 44:14, 2302-2307 (1972).

205. Sellier, N. & Guiochon, G.,

Influence of GC-MS coupling on the performances of a chromatographic column. - Journal of Chromatigraphic Science 8, 147-150 (1970).

206. Guenther, E., Gilbertson, G. & Koenig, R.T.,

Essential oils and related products. - Analytical Chemistry 45:5, 45-67 (1973).

207. Guenther, E., Gilbertson, G. & Koenig, R.T.,

Essential oils and related products. - Analytical Chemistry 47:5, 139-156 (1975).

208. Guenther, E., Gilbertson, G. & Koenig, R.T.,

Essential oils and related products. - Analytical Chemistry 49:5, 83-97 (1977).

209. Granger, R. & Passet, J.,

Biochemie végétale: - Types chimiques (chémotypes) de l´espèces Thymus vulgaris L. Note précentée par M. Maurice Janot- C.R. Acad. Sc Paris 273, 2350-2353 (1971).

210. Granger, R. & Passet, J.,

Thymus vulgaris spontane de France: Races chimiques et chemo-taxonomie - Phytochemistry 12, 1683-1691 (1973).

211. Vernet, P.,

Analyse genetique et ecologique de la variabilité de l´éssence de Thymus vulgaris L. - These Université des Sciences et Techniques du Languedoc 8 november (1976).

212. Stenhagen, E., Abrahamsson, S. och McLafferty, F.W.,

Registry of Mass Spectral Data. - Wiley-Interscience, New York, 1974.

213. Eight Peak Index of Mass Spectra - Mass Spectrometry data centre AWRE, Aldemaston, Reading, RG7, 4PR, UK, Secand Edition, 1974.

214. Kjaer, A., Ohashi, M., Wilson, J.M. och Djerassi, C.,

Mass Spectra of Isothiocyanates. - Acta Chemica Scandinavica 17:8, 2143-2154 (1963).

215. Rotschild, M. & Schoonhoven, L.M.,

Assessment of egg load by Pieris brassicae (Lepidoptera: Pieridae). - Nature 266, 352-355 (1977).

216. Kamm, J.A. & Frank, W.D.,

Olfactory response of alfalfa-seed chalcid, Bruchophagus roddi Guss., to chemicals found in alfalfa. - University of Wyoming Agr. Exp. Sta. Bull. 413, 3-35 (1964).

217. Mac Leod, A.J.,

Volatile flavour compounds of the Cruciferae - In Vaughan, J.G., Mac Leod, A.J. & Jones, B.M.G. (Eds.) The Biology and Chemistry of Cruciferae, Academic Press, 1976, 307-330.

218. Beck, S.D. & Reese, J.C.

Insect-plant interactions: nutrition and metabolism. - In Wallace, J.W.& Mansell, R.L. (Eds.) Biochemical Interaction Between Plants and Insects, Recent Advances in Phytochemistry, Plenum Press, New York and London, 1976, 10, 41-92.

219. Rasmussen, R.A.,

What do the hydrocarbons from trees contribute to air pollution? - Journal of the Air Pollution Control Association 22:7, 537-543 (1972).

220. Whittaker, R.H. & Feeny, P.P.,

Allelochemics: chemical interactions between species. - Science 171, 757-770 (1971).

221. Tukey Jr, H.B. & Mecklenburg, R.A.,

Leaching of metabolites from foliage and subsequent reabsorption and redistribution of the leachate in plants. - American Journal of Botany 51:7, 737-742 (1964).

222. Hansson, L. & Nilsson, B. (Eds.),

Biocontrol of Rodents, Ecological Bulletins No 19, Statens Naturvetenskapliga Forskningsråd (NFR) Stockholm, 1975.

223. Freeland, W.J. & Janzen, D.H.,

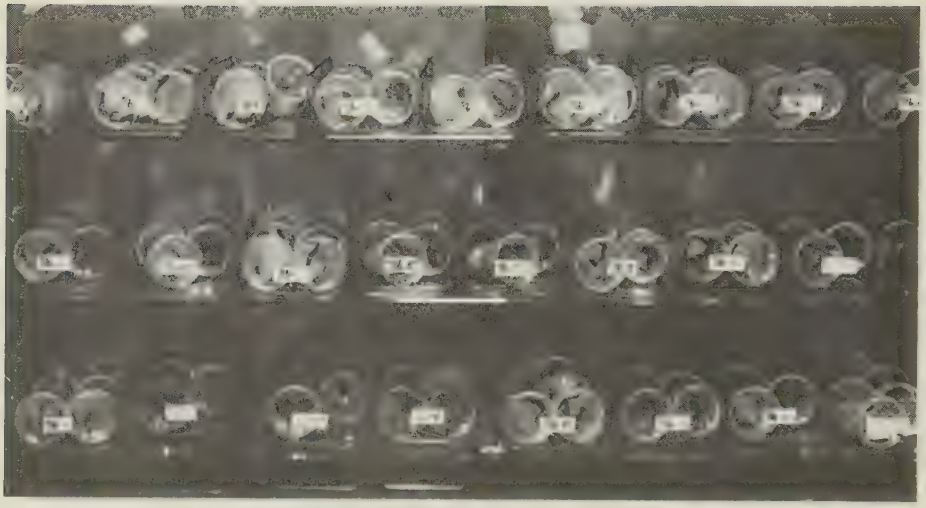
Strategies in herbivory by mammals: the role of plant secondary compounds. - The American Naturalist 108: 961, 269-289 (1974).

224. Mitscher, L.A.,

Antimicrobial agent form higher plants. - In Runeckles, V.G. (Ed.) Recent Advances in Phytochemistry vol. 9, Plenum Press, New York och London, 1975, 243-282.

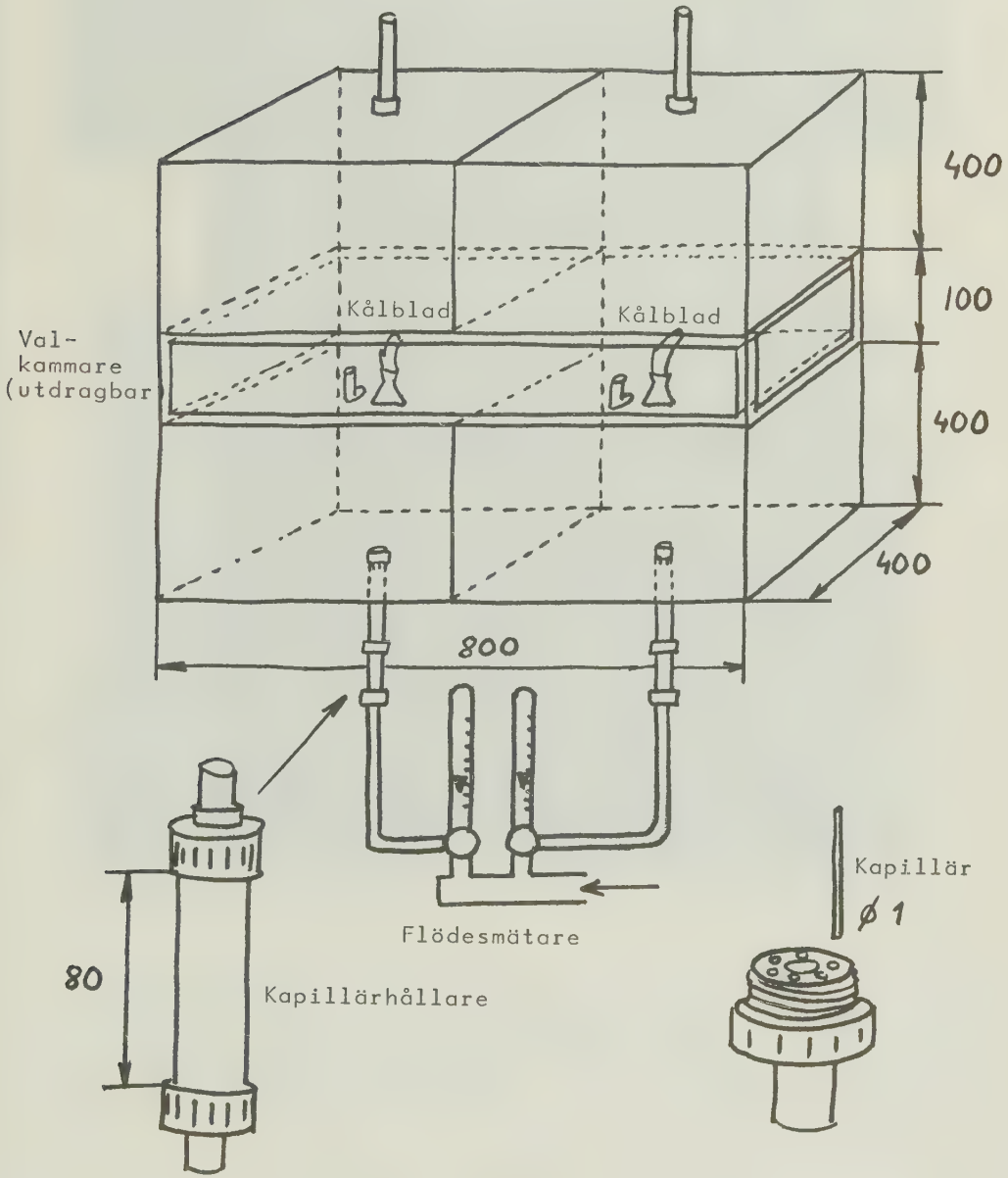
225. Elliot, M.,

Future use of natural and synthetic pyrethroids. In Metcalf, R.L. & Mc Kelvey Jr, J.J. (Eds.) The Future for Insecticides, Needs and Prospects, Vol 6 in Advances in Environmental Science and Technology, Wiley New York, 1976, 163-193.

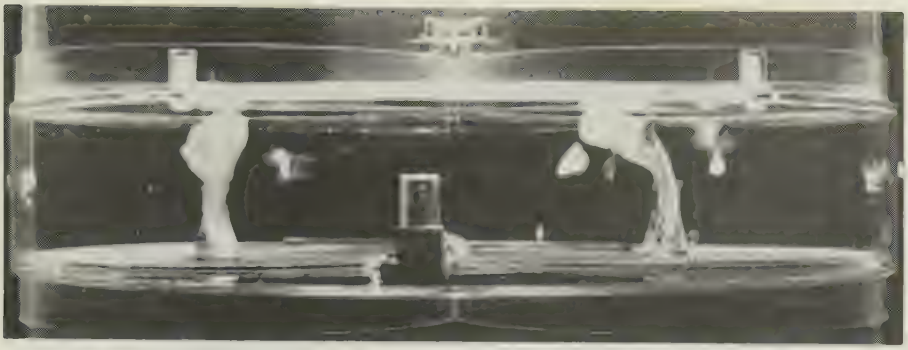


Figur 1. Engångsaskar av polystyren för uppfödning av larver av Pieris brassicae, P. napi och P. rapae på ett halvsyntetiskt medium.

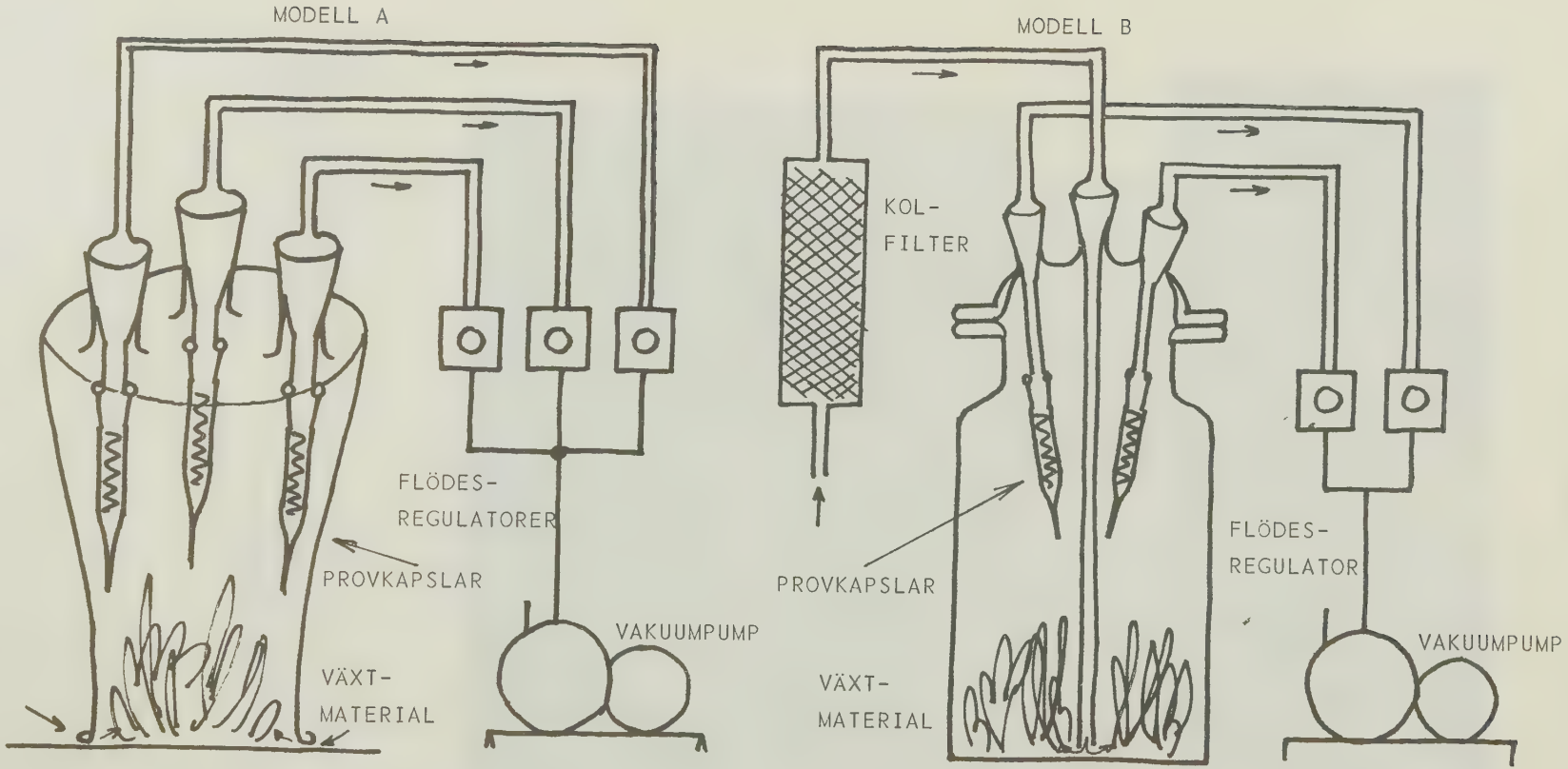
Figur 2. Tvåvalskammare modell IV (mått i millimeter)



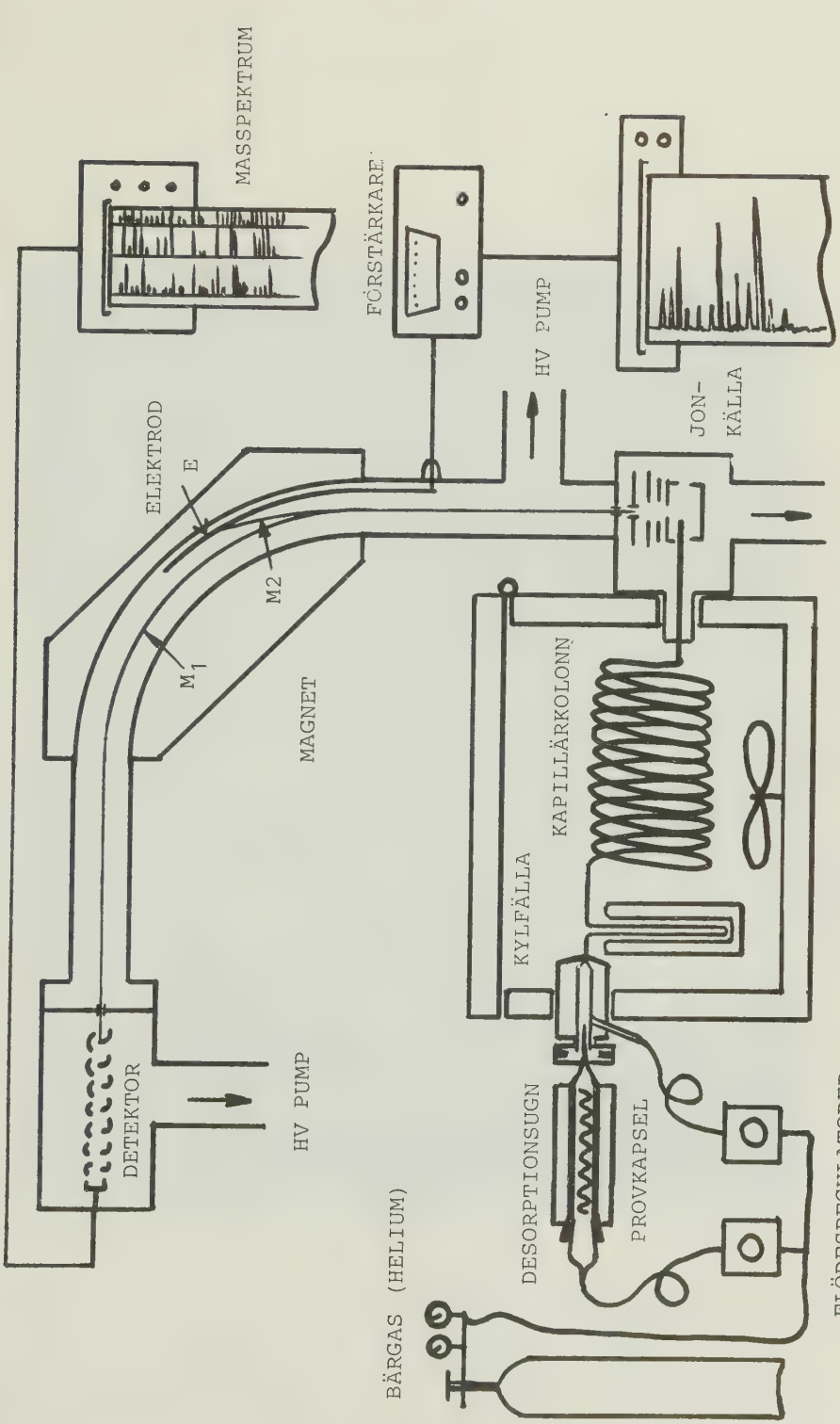
Figur 3. Tvåvalskammare modell V. Kammaren består av moduler som lätt kan monteras isär genom att bordet under kammaren sänks. Den översta delen ovanför testdjursmodulen är upphängd i taket. I bakgrunden ännu en testkammare av denna modell.



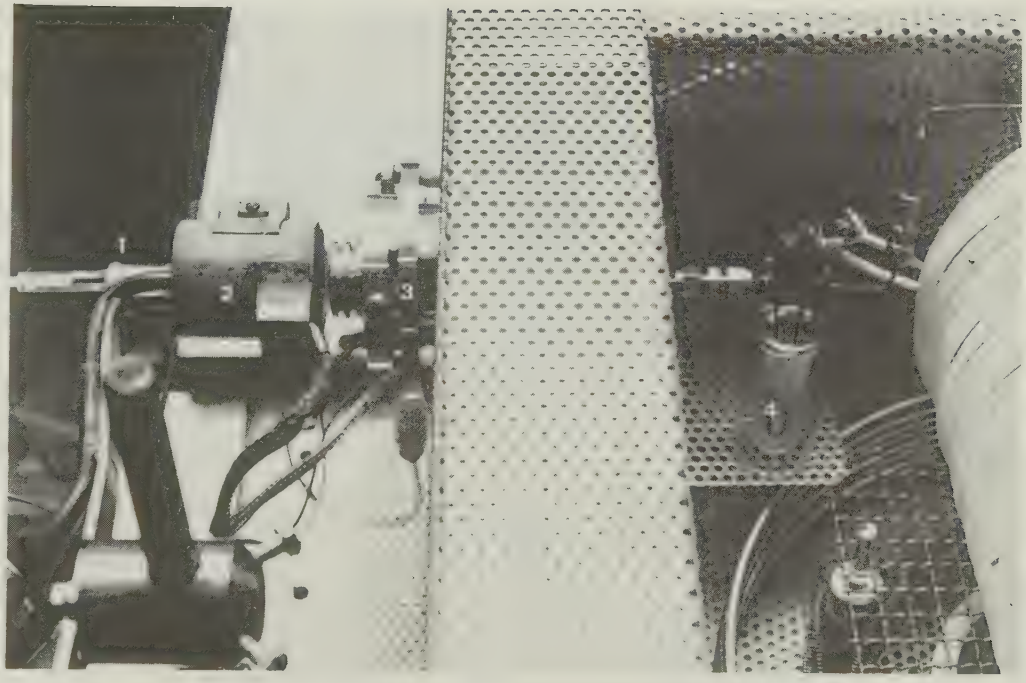
Figur 4. Närbild av testdjursmodulen i tvåvalskammare V samt interiör från en odlingsbur visande rapsfrön, nektarautomater och en bukett kålblad.



Figur 5. Apparatur för adsorption av växtsubstanser

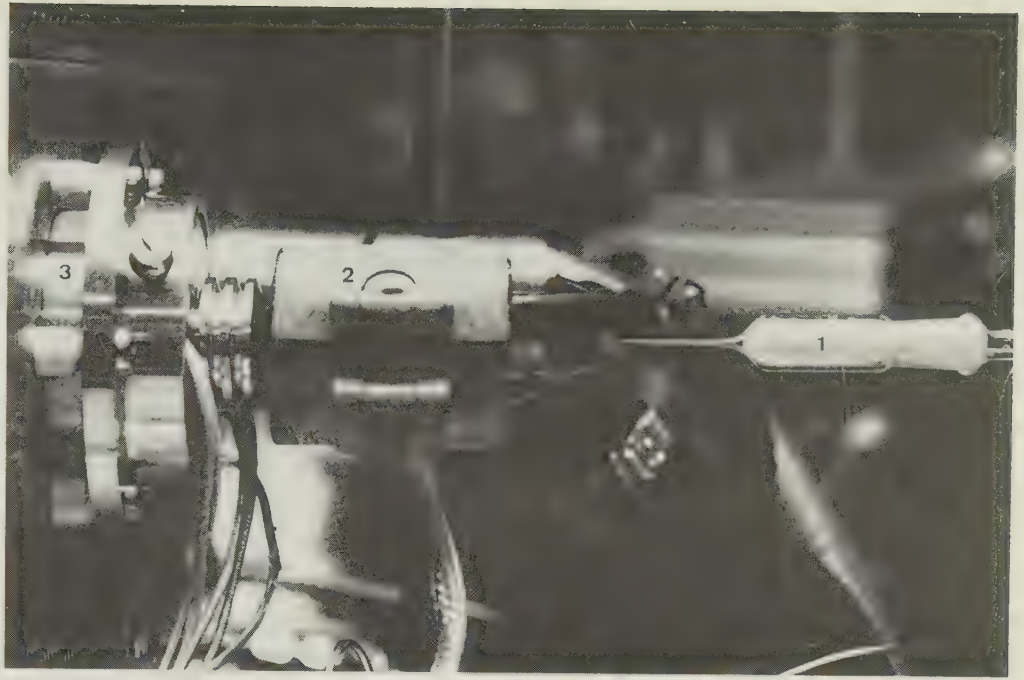


Figur 6. Principschema över GC-MS systemet



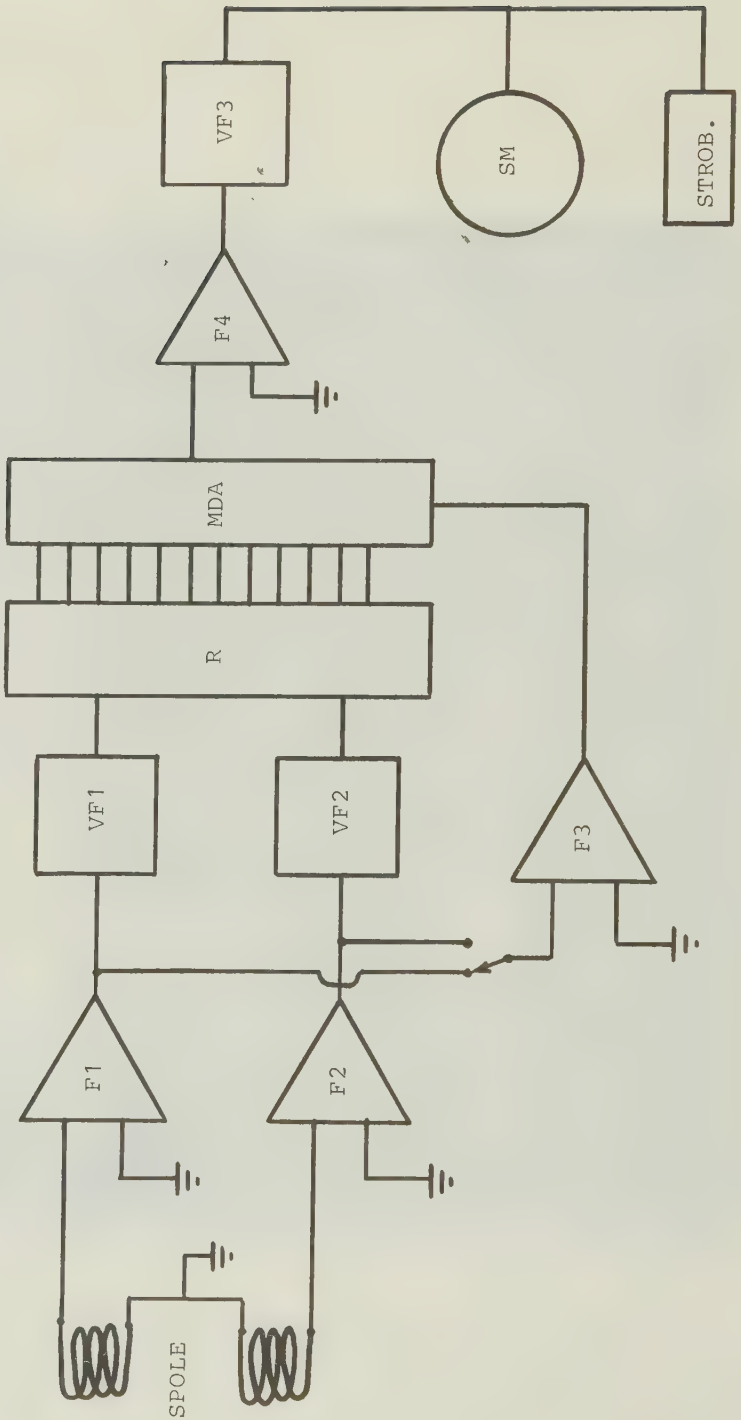
Figur 7. Insläppssystem till kapillärkolonn.

1. Provkapsel
2. Desorptionsugn
3. Insläppsblock
4. Uppvärmbar kylfälla

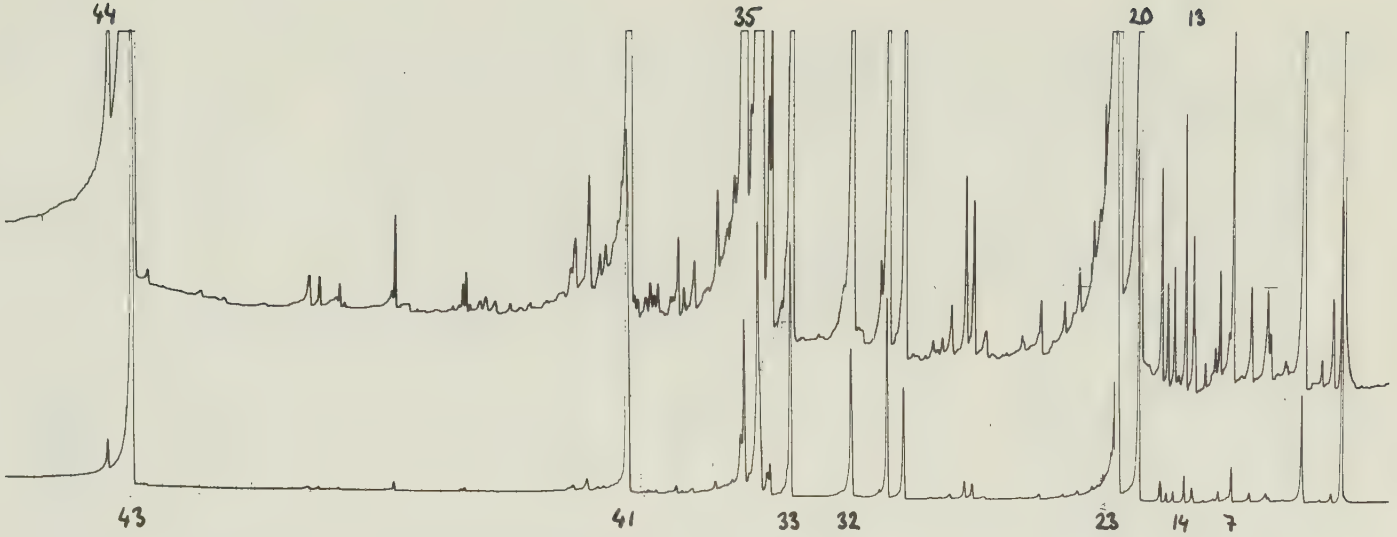


Figur 8. Detaljer till insläppssystem

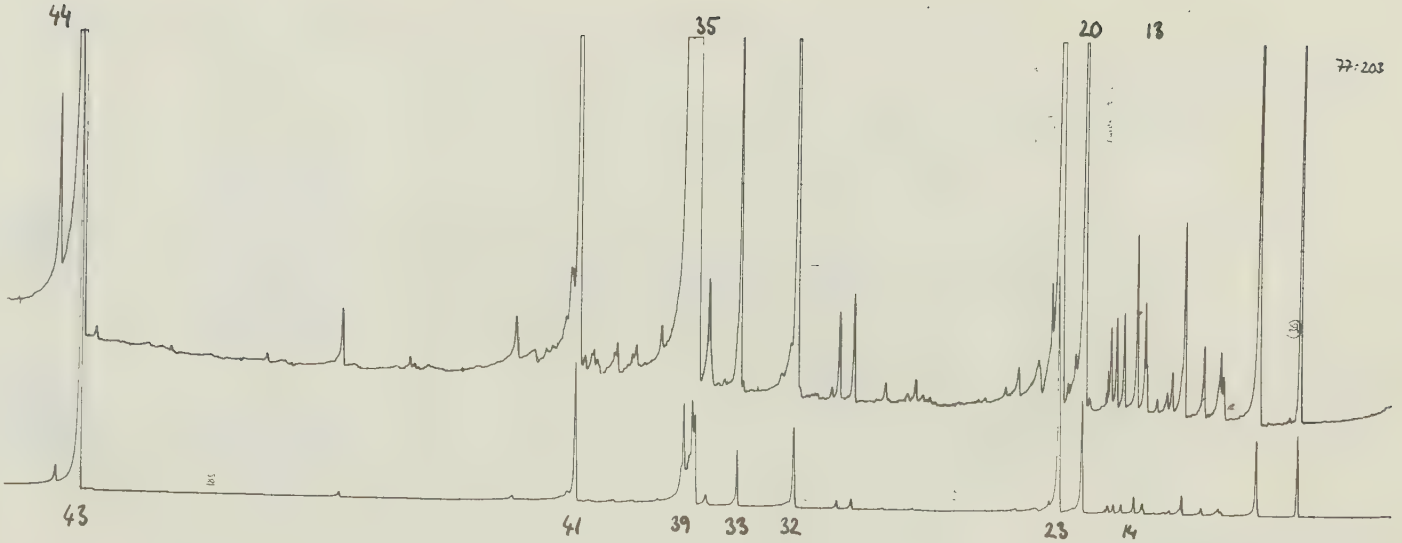
1. Provkapsel med injektionsnål av glas
2. Desorptionsugn
3. Insläppsblock



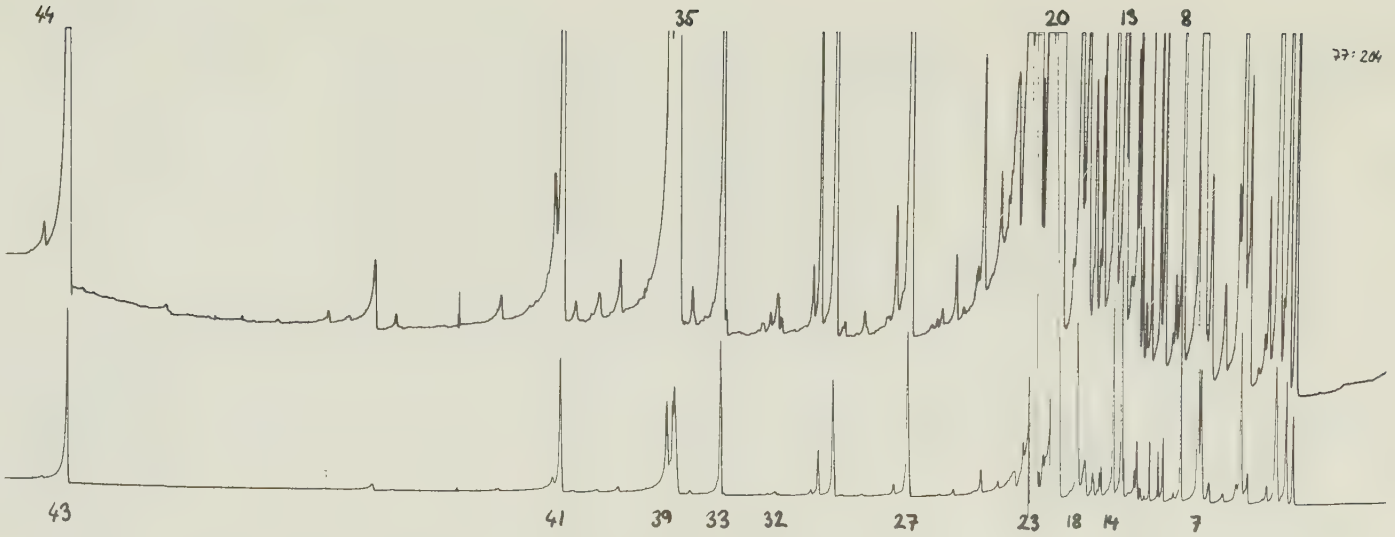
Figur 9. Blockschema över "massmarkerare med linjär masskala"



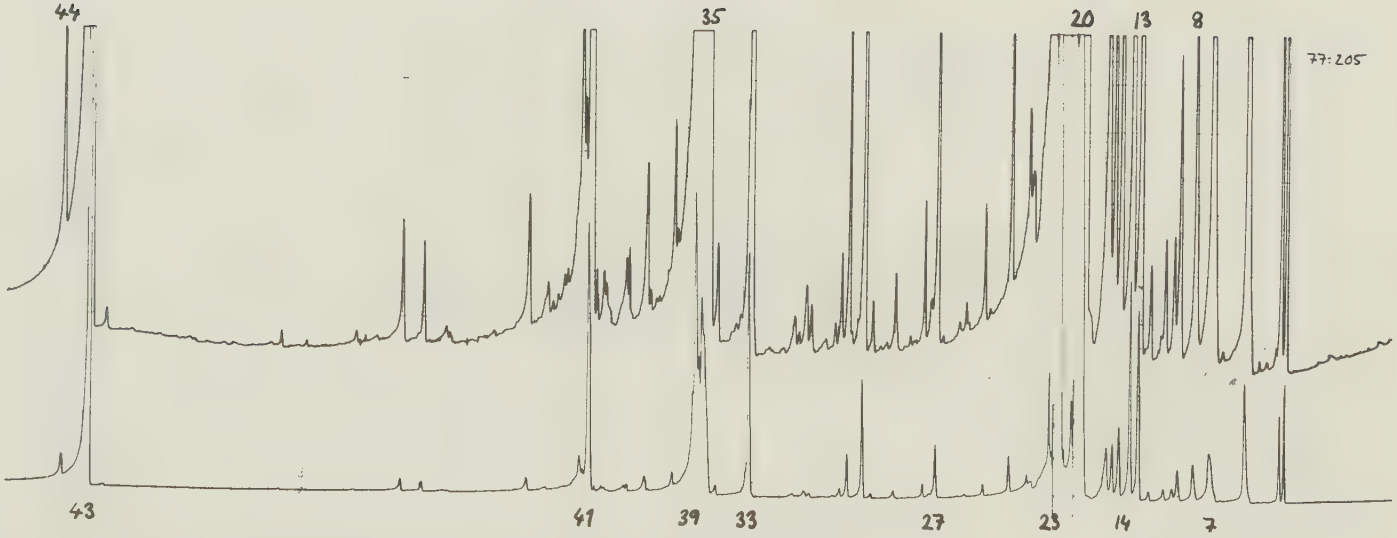
Figur 10. Kapillärgaskromatogram nr 77:202
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris)
Adsorption: 60 min., XE-60 på glasfiberpapper 0,2 gram
Desorption: 12 min., 150° C
Kolonn: Carbowax 20M WCOT, 130 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 50 till 200° C
Jonisation: 70 eV, 300 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)



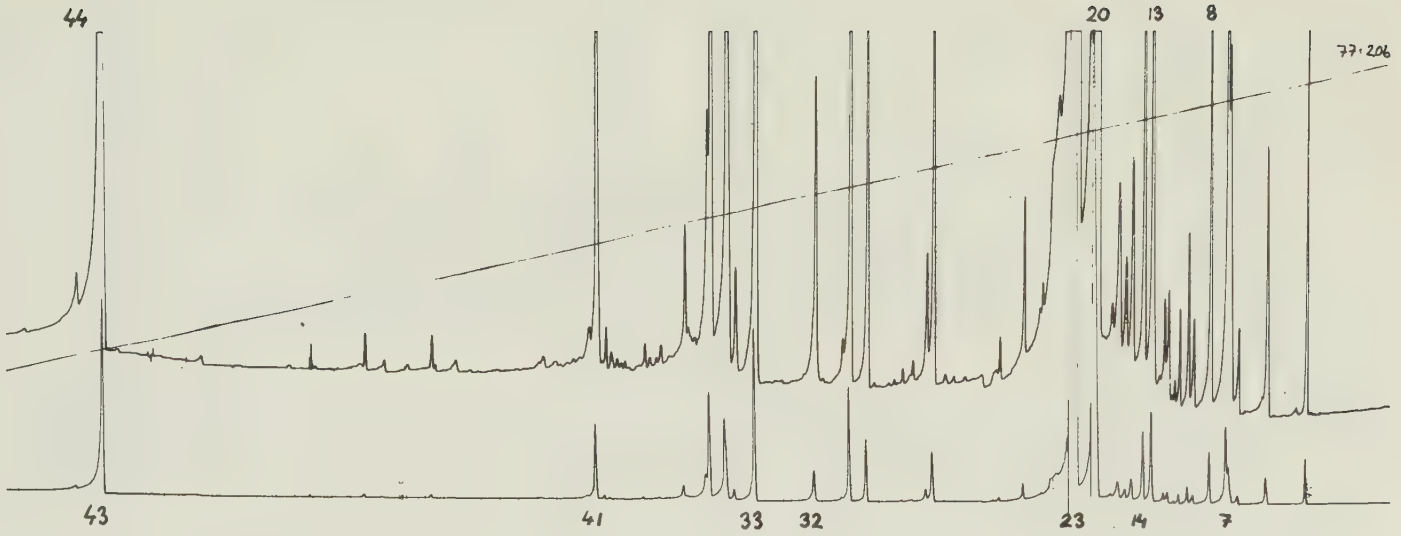
Figur 11. Kapillärgaskromatogram nr 77:203
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris)
Adsorption: 60 min., SE-30 på glasfiberpapper, 0,2 gram
Desorption: 12 min., 150° C
Kolonn: Carowax 20M WCOT, 130 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 50 till 200° C
Jonisation: 70 eV, 300 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)



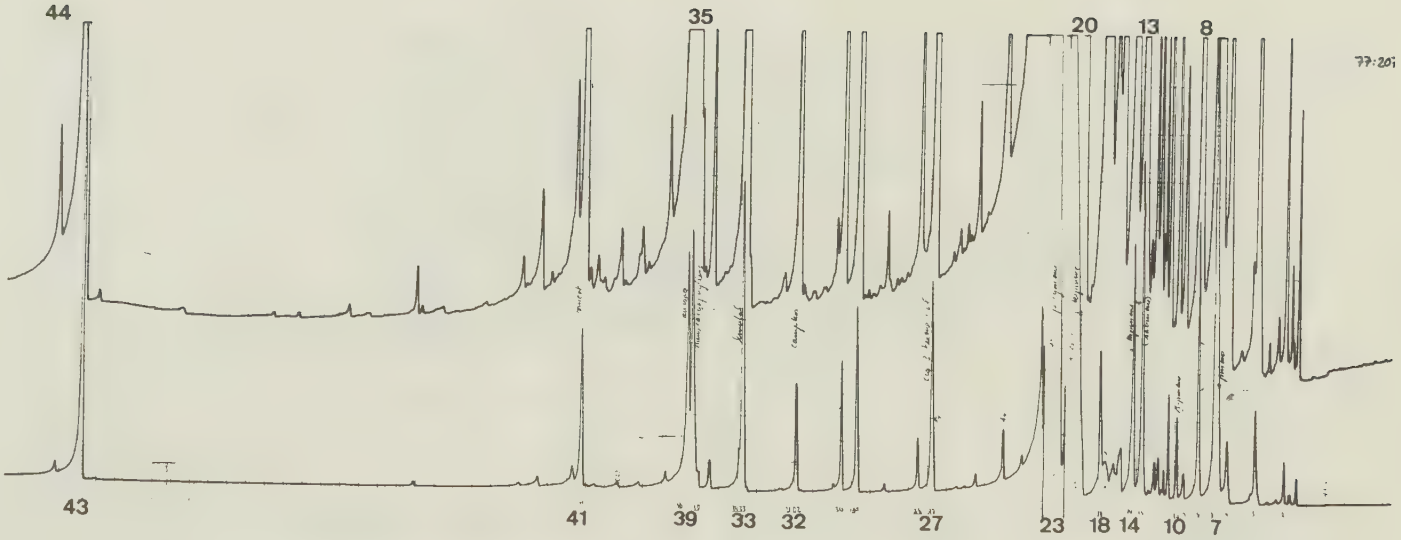
Figur 12. Kapillärgaskromatogram nr 77:204
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris)
Adsorption: 45 min., Tenax-GC, 0,2 gram
Desorption: 12 min., 150° C
Kolonn: Carowax 20M WCOT,130 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 50 till 200° C
Jonisation: 70 eV, 60 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)



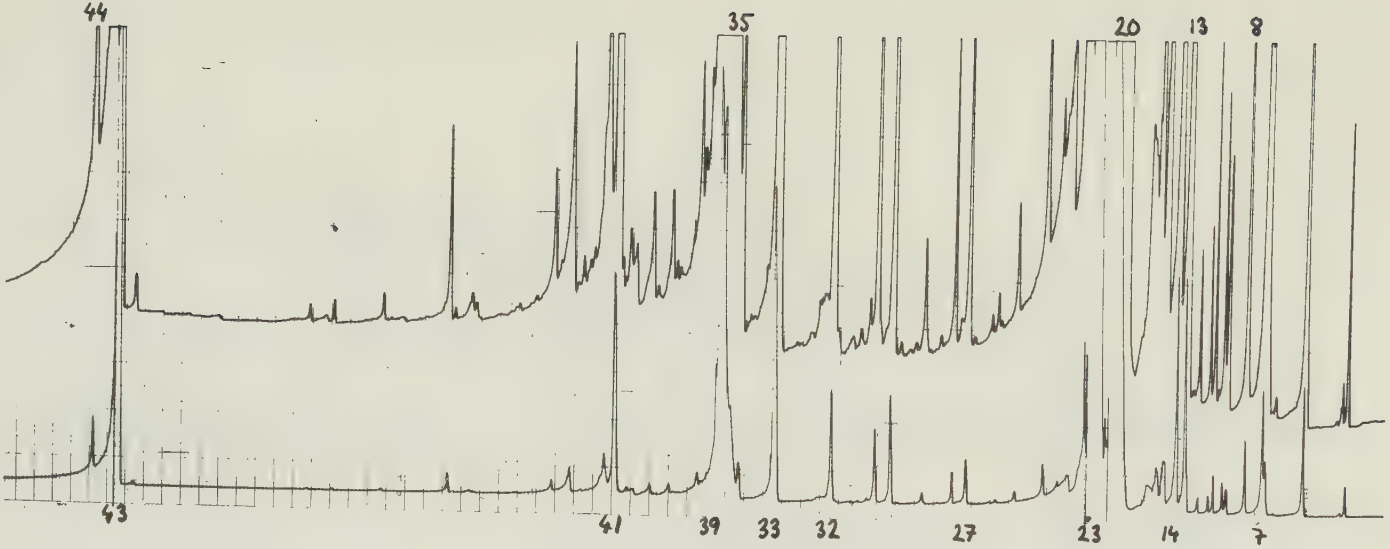
Figur 13. Kapillärgaskromatogram nr 77:205
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris)
Adsorption: 45 min., SE-30 på glasfiberpapper, 0,2 gram
Desorption: 12 min., 150° C
Kolonn: Carbowax 20M WCOT, 130 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 50 till 200° C
Jonisation: 70 eV, 60 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)



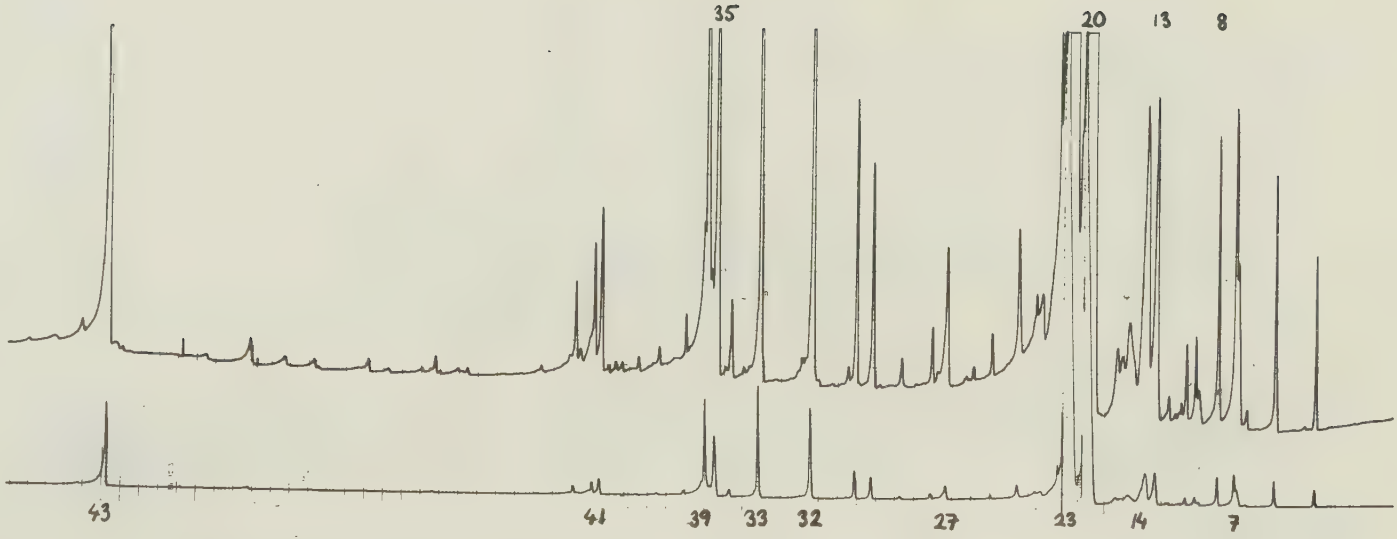
Figur 14. Kapillärgaskromatogram nr 77:206
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 3 gram (LLa)
Adsorption: 45 min., XE-60 på glasfiberpapper, 0,2 gram
Desorption: 12 min., 150° C
Kolonn: Carbowax 20M WCOT, 130 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 50 till 200° C
Jonisation: 70 eV, 60 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)



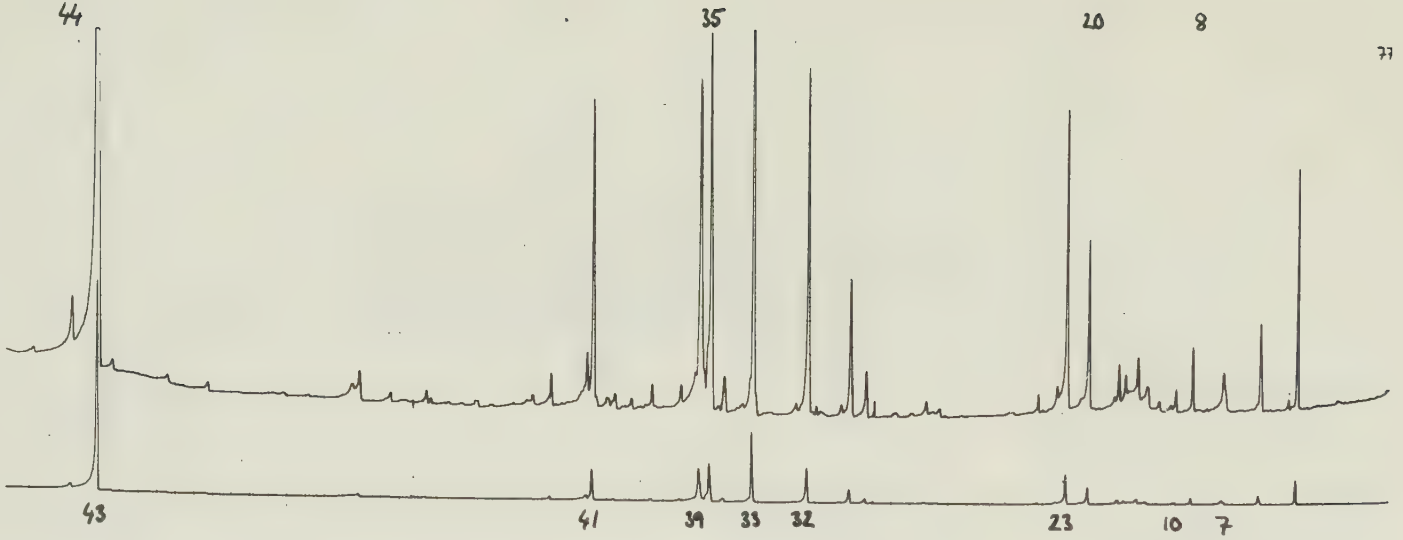
Figur 15. Kapillärgaskromatogram nr 77:207
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 3 gram (LLa)
Adsorption: 45 min., Tenax-GC, 0,2 gram
Övriga data se figur 14.



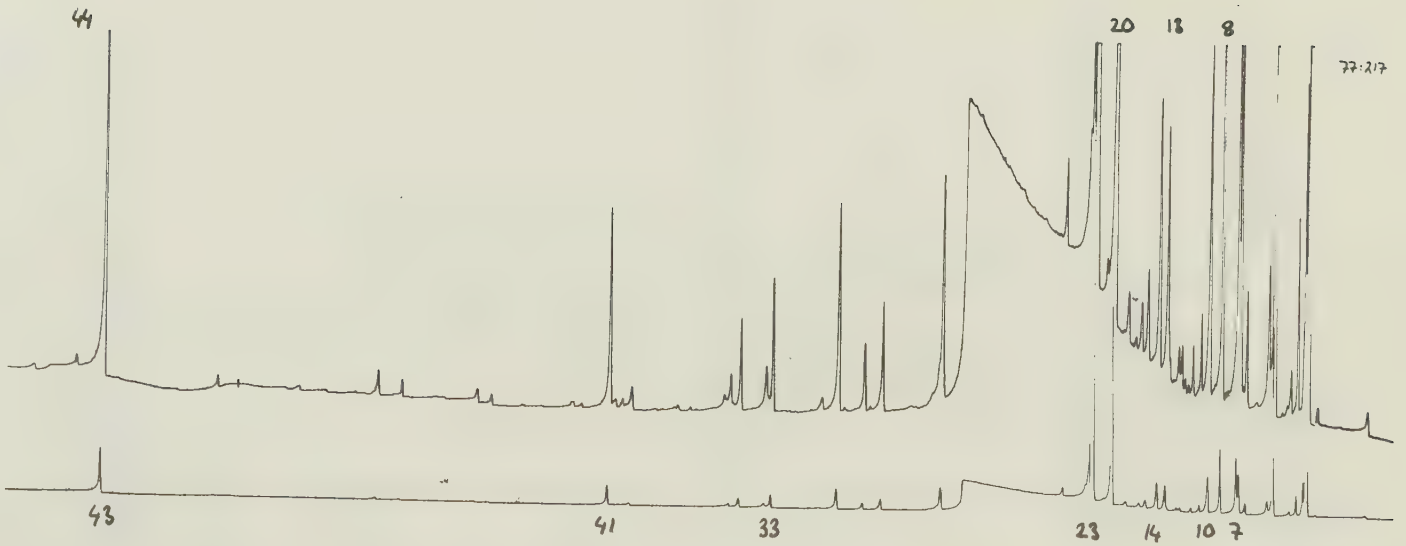
Figur 16. Kapillärgaskromatogram nr 77:208
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 3 gram (LLa)
Adsorption: 45 min., SE-30 på glasfiberpapper, 0,2 gram
Övriga data se figur 14



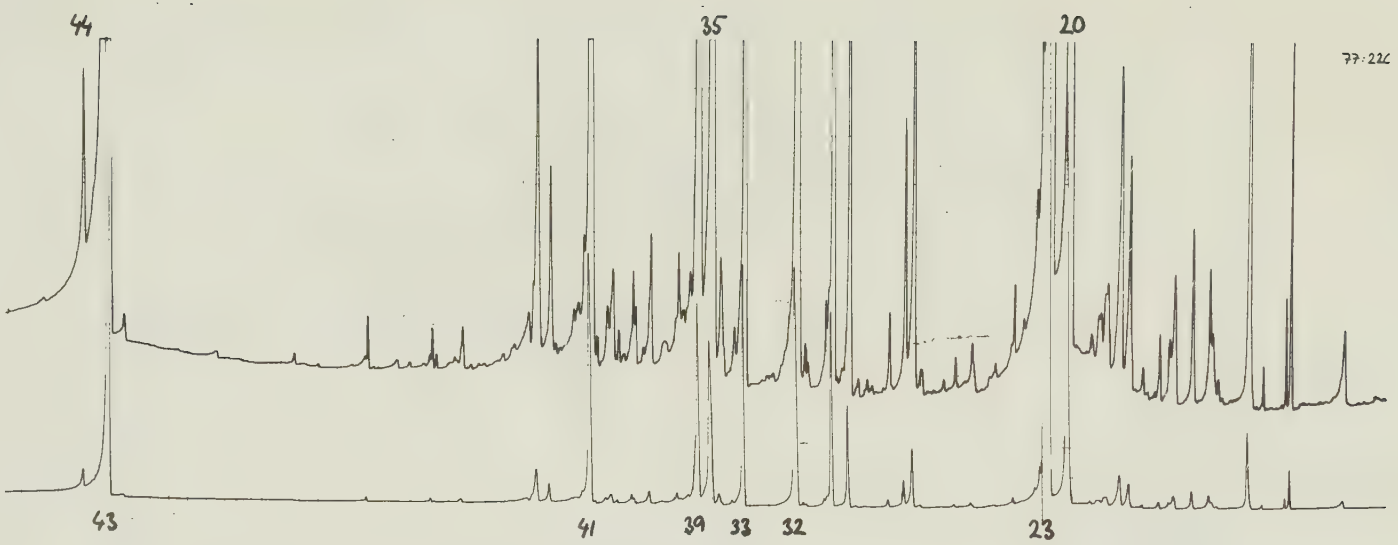
Figur 17. Kapillärgaskromatogram nr 77:210
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 2,3 g (LLa)
Adsorption: 45 min., Santovac 5 på glasfiberpapper, 0,2 gram
Övriga data se figur 14



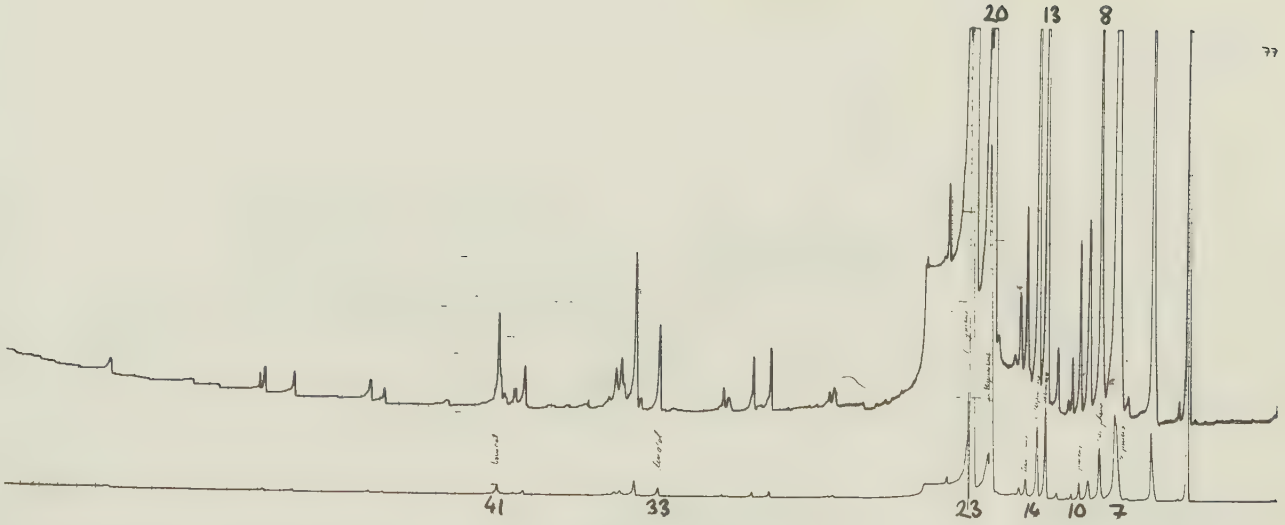
Figur 18. Kapillärgaskromatogram nr 77:213
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 1,8 g (LLa)
Adsorption: 45 min., Lion-S på glasfiberpapper, 0,2 g
Övriga data de figur 14



Figur 19. Kapillärgaskromatogram nr 77:217
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 2,0 g (LLb)
Adsorption: 45 min., Chromosorb 102, 0,2 g
Övriga data se figur 14



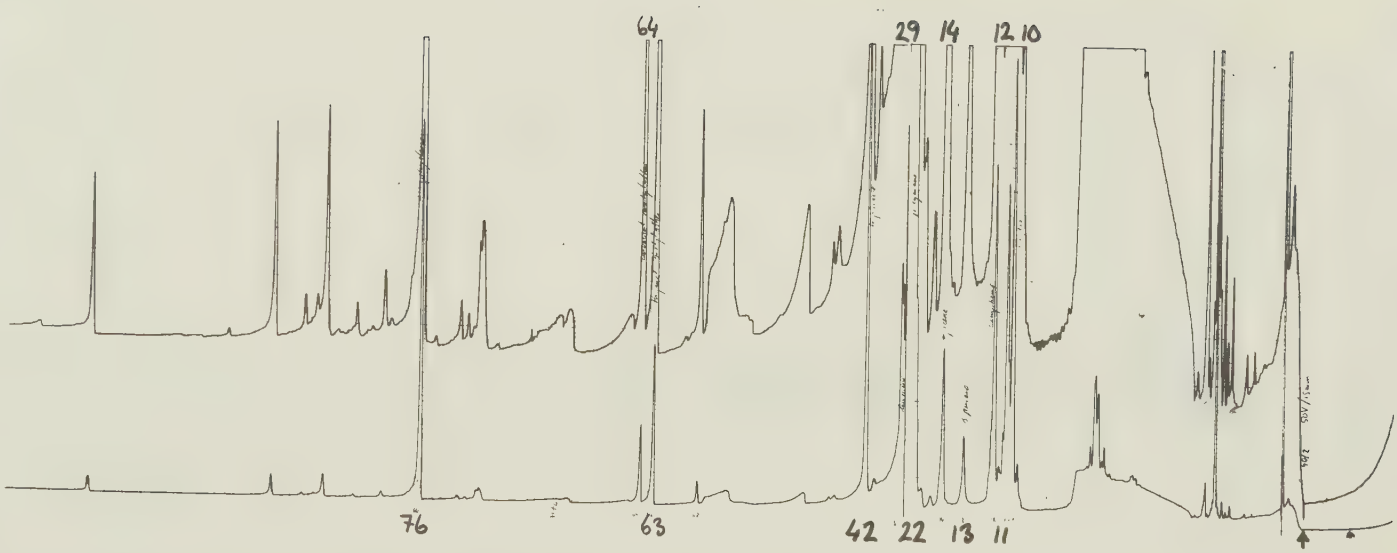
Figur 20. Kapillärgaskromatogram nr 77:220
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 2,0 g (LLc)
Adsorption: 45 min., XE-60 på glasfiberpapper, 0,2 g
Övriga data se figur 14.



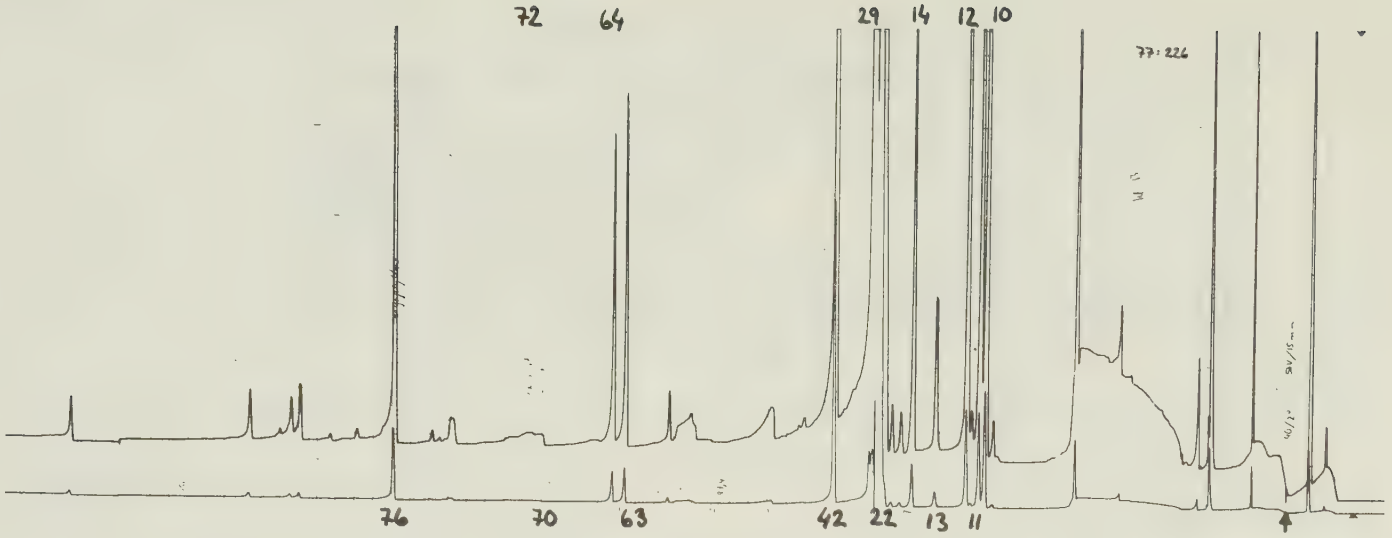
Figur 21. Kapillärgaskromatogram nr 77:222
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 0,9 g (LLc)
Adsorption: -
Desorption: Direkt kondensering i kylfällan av spontant avgivna ämnen under 20 min. vid 25° C
Övriga data se figur 14

Figurförklaring 1. Identifierade substanser från trädgårdstimjan (Thymus vulgaris) separerade med Carbowax 20M kolonn enligt figurerna 10 - 21.

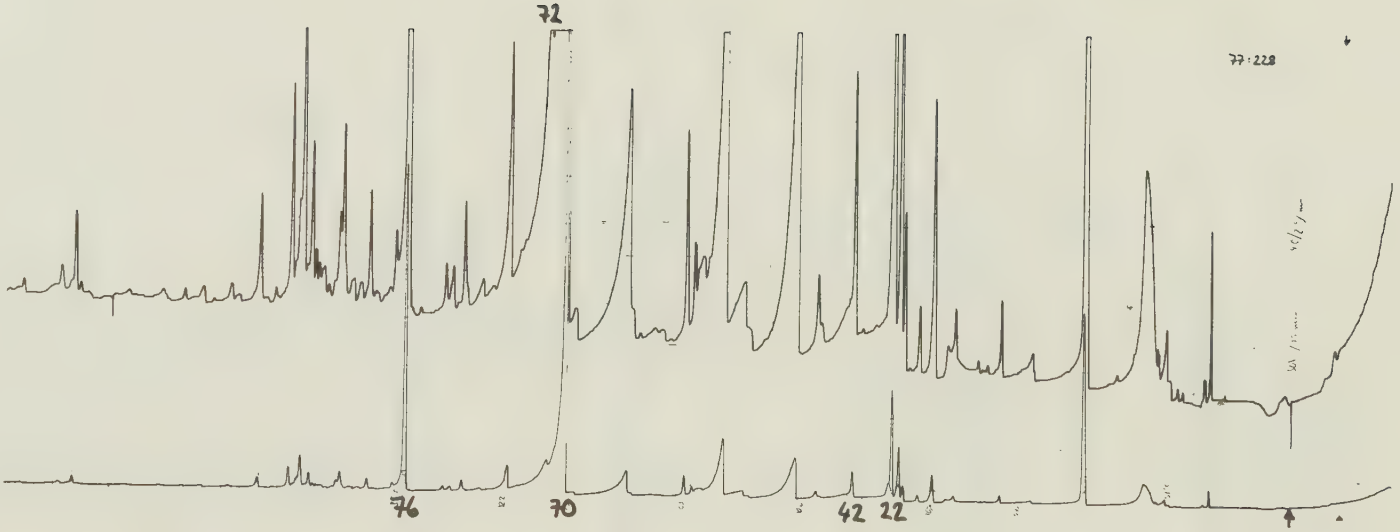
Nr	Identifierad substans	Molekylvikt	Masspektrum nr
7	α-pinene	136	77:211 (7)
8	camphene	136	" (8)
10	β-pinene	136	" (10)
13	sabinene	136	" (13)
14	α-terpinene	136	" (14)
15	limonene	136	" (15)
17	1.8. cineole	154	" (17)
18	2-hexenal	98	" (18)
20	γ-terpinene	136	" (20)
23	p-cymene	134	" (23)
27	cis-hexene-1-ol	100	" (27)
32	camphor	152	" (32)
33	linalol	154	" (33)
35	trans-carophyllene	204	" (35)
39	anisole	164	" (39)
41	borneol	154	" (41)
43	thymol	150	" (43)
44	carvacrol	150	" (44)



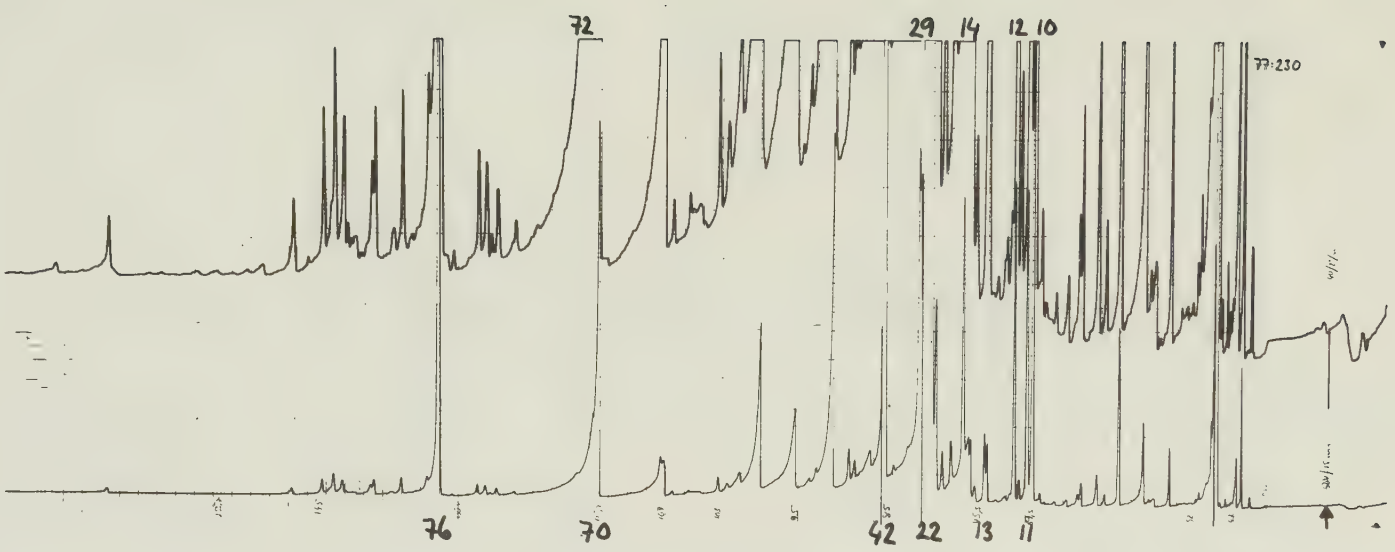
Figur 22. kapillärgaskromatogram nr 77:224
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 0,9 g (LLc)
Adsorption: -
Desorption: Direkt kondensering i kylfällan av spontant avgivna ämnen under 15 min. vid 25° C
Kolonn: SE-30 SCOT, 63 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 40 till 220° C
Jonisation: 70 eV, 300 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)



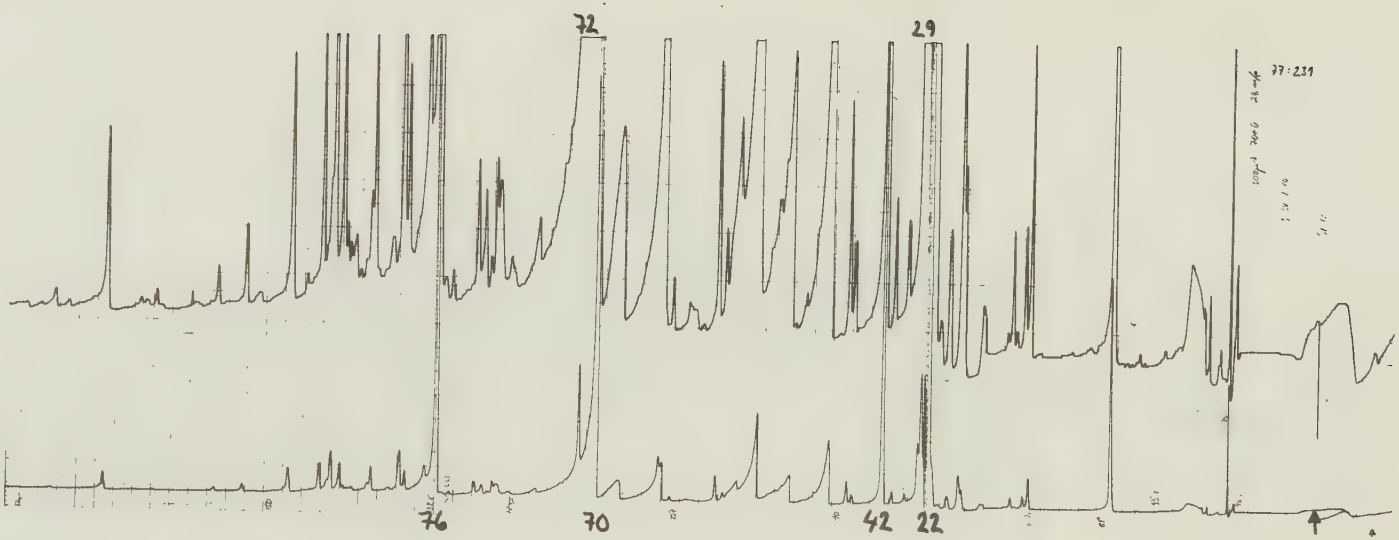
Figur 23. Kapillärgaskromatogram nr 77:226
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 0,9 g (LLc)
Adsorption: -
Desorption: Direkt kondensering i kylfällan av spontant avgivna ämnen under 15 min. vid 25° C
Övriga data se figur 22



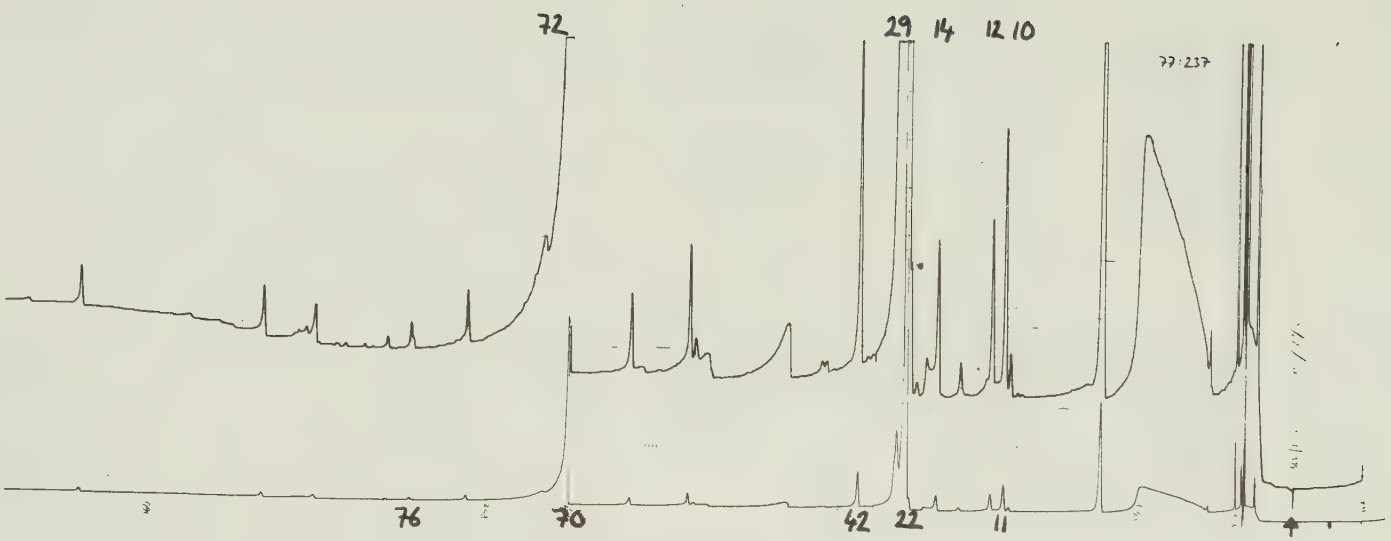
Figur 24. Kapillärgaskromatogram nr 77:228
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 1,5 g (LLc)
Adsorption: 45 min., Lion-S på glasfiberpapper, 0,2 g
Desorption: 15 min., 150° C
Kolonn: SE-30 SCOT, 63 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 40 till 220° C
Jonisation: 70 eV, 300 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)



Figur 25. Kapillärgaskromatogram nr 77:230
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 1,5 g (LLc)
Adsorption: 45 min., Tenax-GC, 0,2 g
Desorption: 15 min., 150° C
Övriga data se figur 24



Figur 26. Kapillärgaskromatogram nr 77:231
Objekt: Färsk trädgårdstimjan (Thymus vulgaris), 1,5 g (LLc)
Adsorption: 45 min., SE-30 på glasfiberpapper, 0,2 g
Desorption: 15 min., 150° C
Övriga data se figur 24

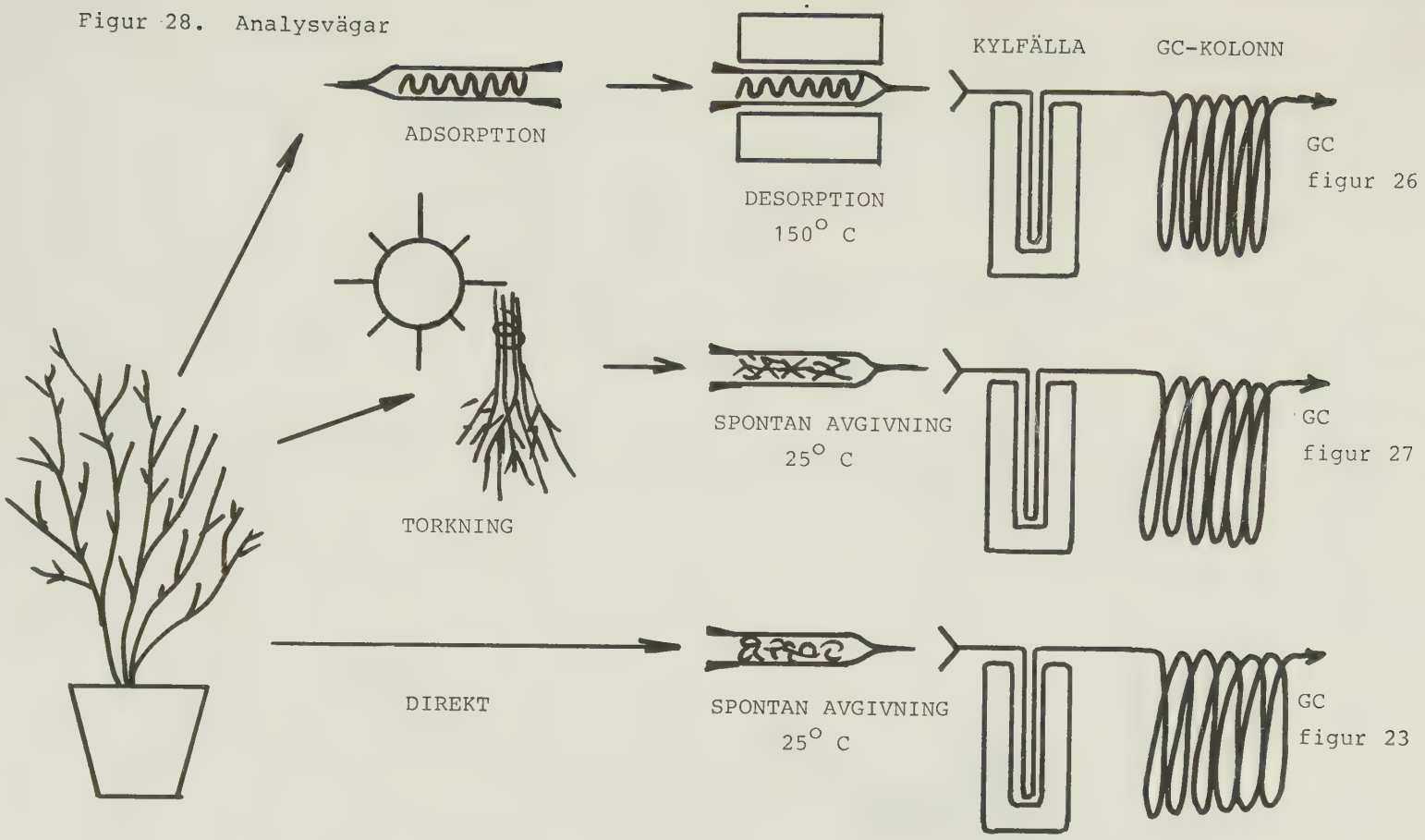


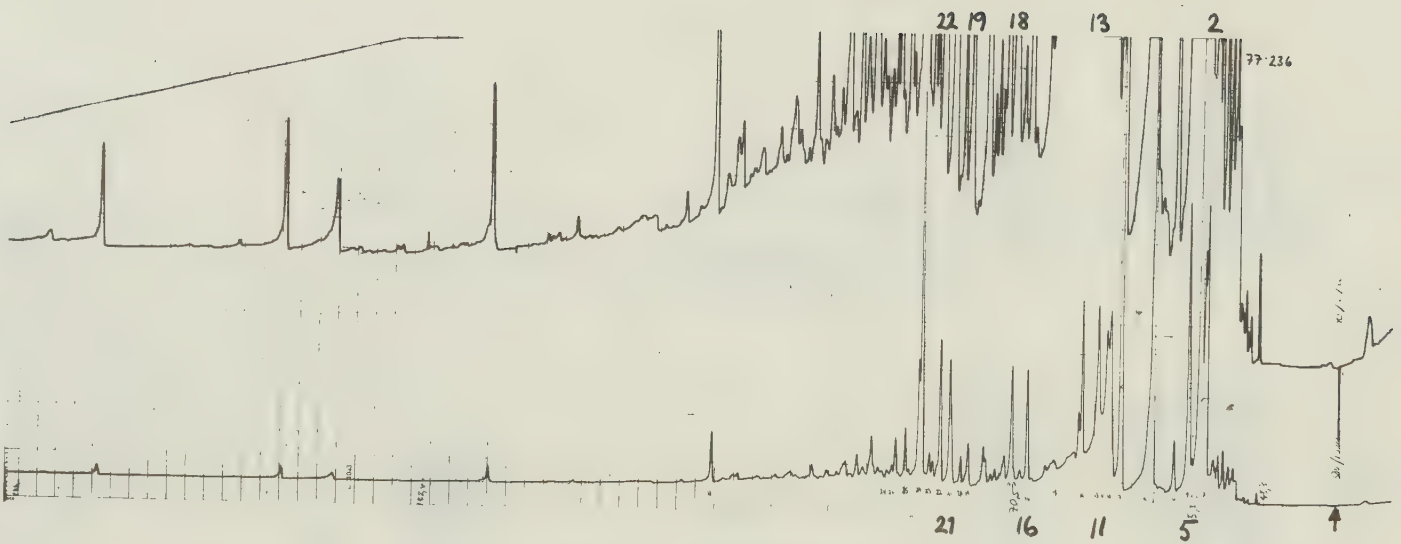
Figur 27. Kapillärgaskromatogram nr 77:237
Objekt: Torkad timjan (Thymus vulgaris) apoteksvara, 0,2 g
Adsorption: -
Desorption: Direkt kondensering i kylfällan av spontant avgivna ämnen under 15 min. vid 25° C
Kolonn: SE-30 SCOT, 63 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min. från 40 till 220° C
Jonisation: 70 eV, 300 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)

Figurförklaring 2. Identifierade substanser från trädgårdstimjan (Thymus vulgaris) separerade med SE-30 kolonn enligt figurerna 22 - 27.

Nr	Identifierad substans	Molekylvikt	Masspektrum nr
10	α-thujene	136	77:225 (10)
11	α-pinene	136	" (11)
12	camphene	136	" (12)
13	β-pinene	136	" (13)
14	myrcene	136	" (14)
22	p-cymene	134	" (22)
29	limonene	136	" (29)
42	γ-terpinene	136	" (42)
63	thymol methylether	164	" (63)
64	carvacrol methylether	164	" (64)
70	thymol	150	"
76	carophyllene	204	"

Figur 28. Analysvägar

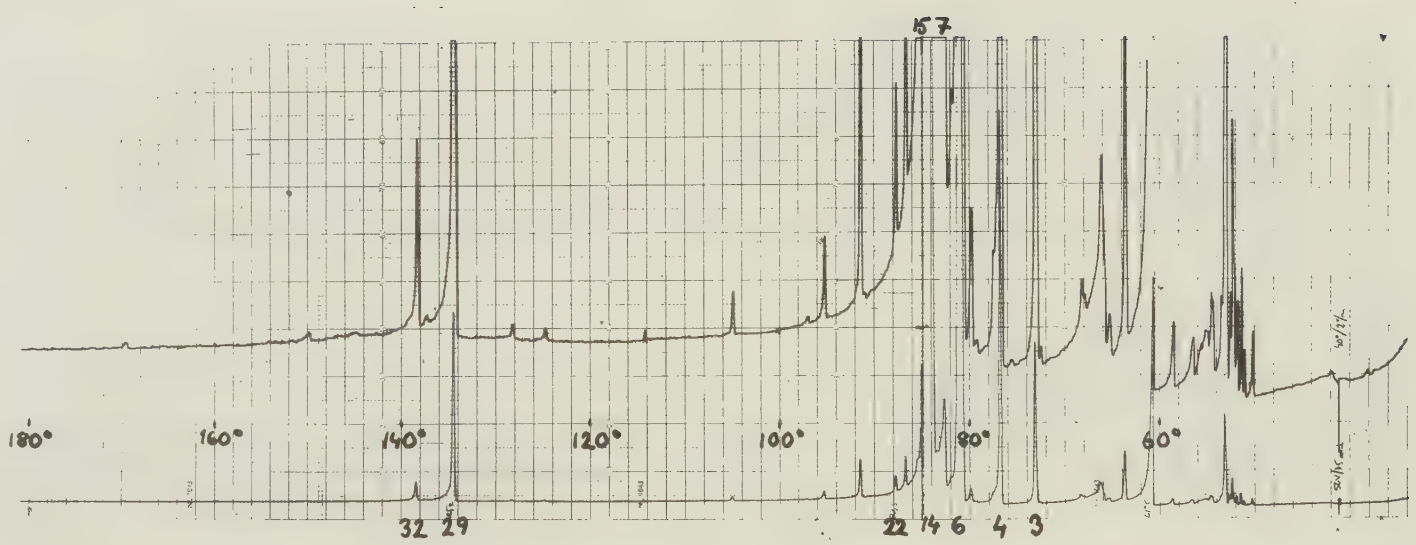




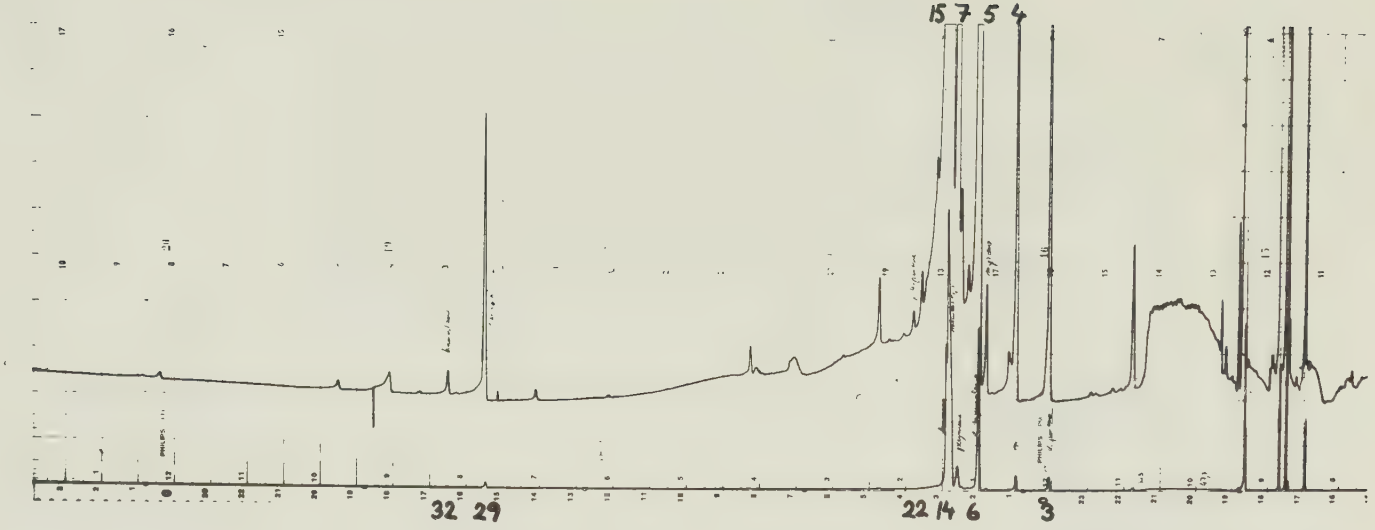
Figur 29. Kapillärgaskromatogram nr 77:236
Objekt: Djupfryst lomme (Capsella bursa pastoris), 4,0 ♂ (M)
Adsorption: 90 min. under upptining, Tenax-GC, 0,2 g
Desorption: 15 min., 150° C
Kolonn: SE-30 SCOT, 63 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 40 till 220° C
Jonisation: 70 eV, 300 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)

Figurförklaring 3. Identifierade substanser från lomme (Capsella bursa pastori) separerade med SE-30 kolonn enligt figur 27.

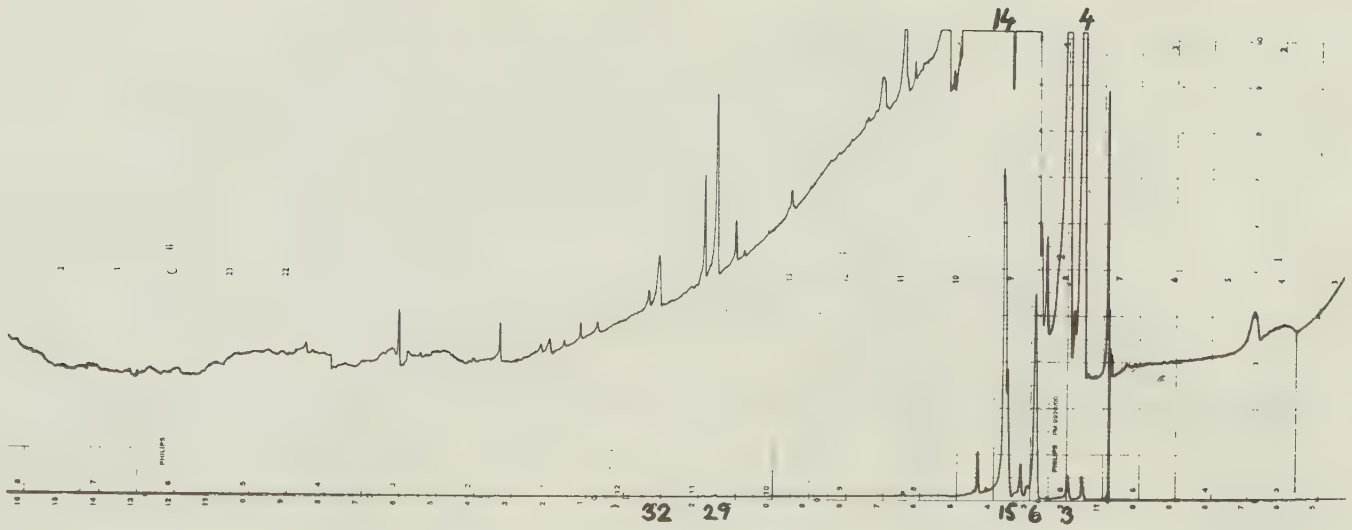
Nr	Identifierad substans	Molekylvikt	Masspektrum nr
2		100	77:235 (2)
5	2,3-dithiabutane	94	" (5)
11		98	" (11)
13		106	" (13)
16	α-pinene	136	" (16)
18	(svavelinnehållande)	126	" (18)
19		120	" (19)
21	monoterpene	136	" (21)
22	"	136	" (22)



Figur 30. Kapillärgaskromatogram nr 77:242
Objekt: Djupfryst tomat (Solanum lycopersicum), 10 g unga bladskott
Adsorption: 30 min. under upptining, Tenax-GC, 0,2 g
Desorption: 15 min., 150° C
Kolonn: SE-30 SCOT, 63 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 40 till 220° C
Jonisation: 70 eV, 300 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)



Figur 31 Kapillärgaskromatogram nr 78:28
Objekt: Djupfrysta tomatskott (Solanum lycopersicum)
Adsorption: -
Desorption: Direkt kondensering i kylfällan av spontant avgivna föreningar under 20 min. vid 25° C
Kolonn: SE-30 SCOT, 63 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 40 till 220° C
Jonisation: 70 eV, 300 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)

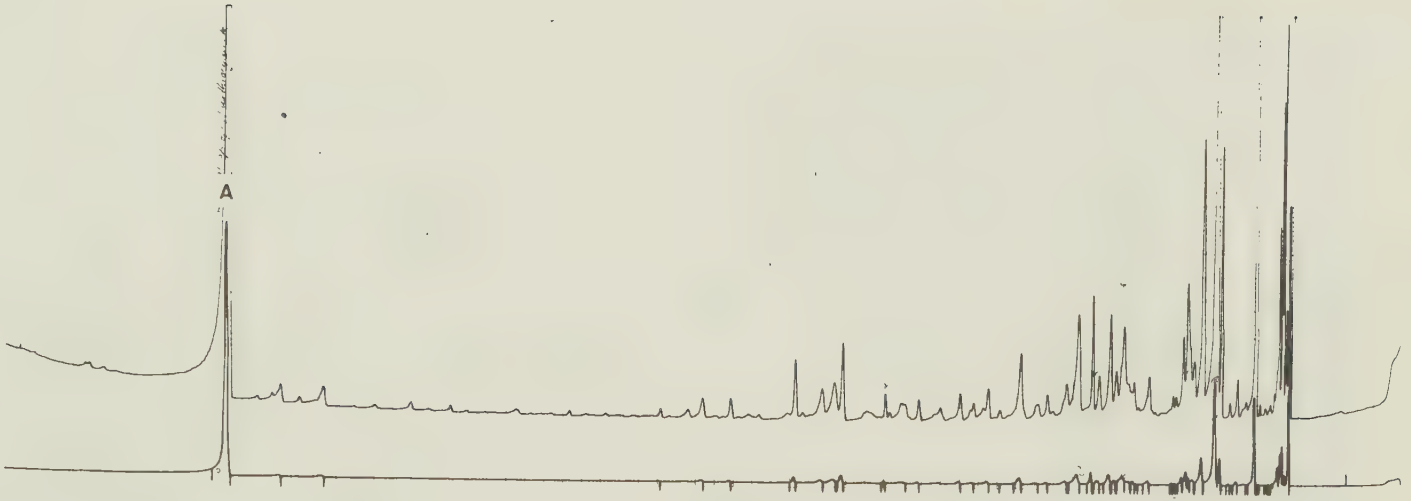


Figur 32 Kapillärgaskromatogram nr 78:23
Objekt: Djupfrysta tomatskott (Solanum lycopersicum)
Adsorption: -
Desorption: Direkt kondensering i kylfällan av spontant avgivna föreningar under 20 min. vid 25° C
Kolonn: Carbowax 20M WCOT, 130 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 50 till 200° C
Jonisation: 70 eV, 300 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)

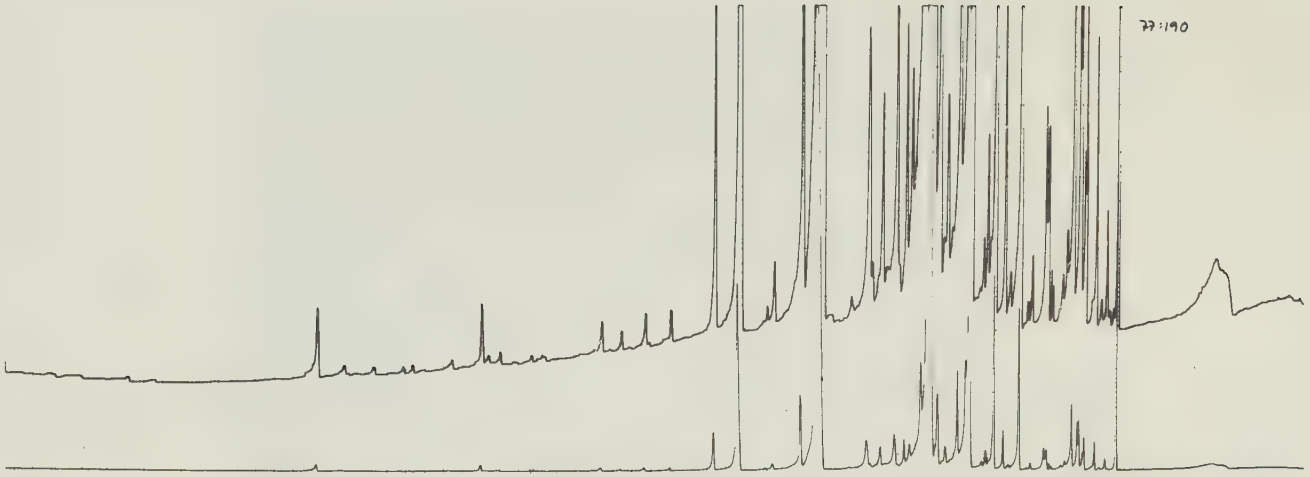
Figurförklaring 4.

Identifierade substanser från tomat (Solanum lycopercicum) separerade med SE-30 kolonn enligt figurerna 30-31 samt med Carbowax 20 M kolonn enligt figur 32.

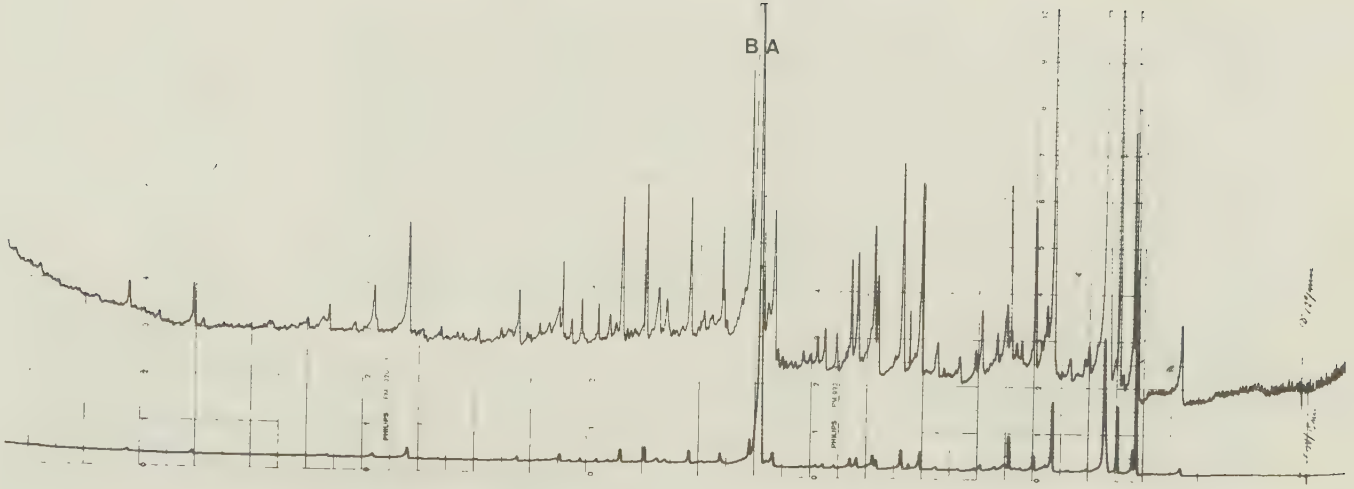
Nr	Identifierad substans	Molekylvikt	Masspektrum nr
3	α-pinene	136	78:25 (7)
4		134	78:25 (8)
5	myrcene	136	78:25 (10)
6	α-terpinolene	136	78:25 (11)
7	p-cymene	134	78:25 (15)
14	monoterpen (sabinentyp)	136	78:26 (15)
15	limonene	136	78:26 (16)
22	γ-terpinene	136	78:25 (20)
29	trans-caryophyllene	204	78:243 (228)
32	humulene	204	76:190 (26)



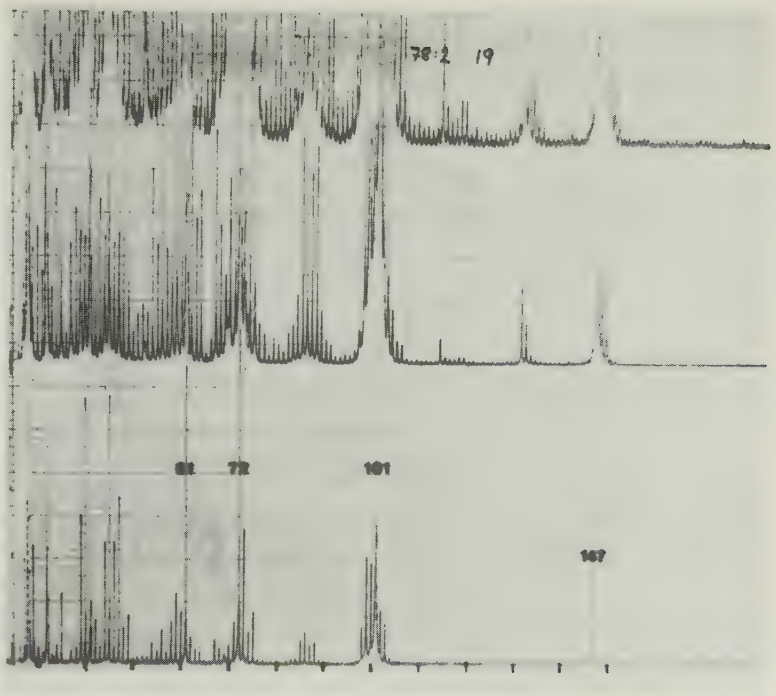
Figur 33. Kapillärgaskromatogram nr 77:246
Objekt: Djupfryst gyllenlack (Cheiranthus cheiri), 4 g
Adsorption: 45 min. under upptining, Tenax-GC,0,2 g
Desorption: 15 min., 150° C
Kolonn: FFAP SCOT, 53 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 40 till 200° C
Jonisation: 70 eV, 300 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)



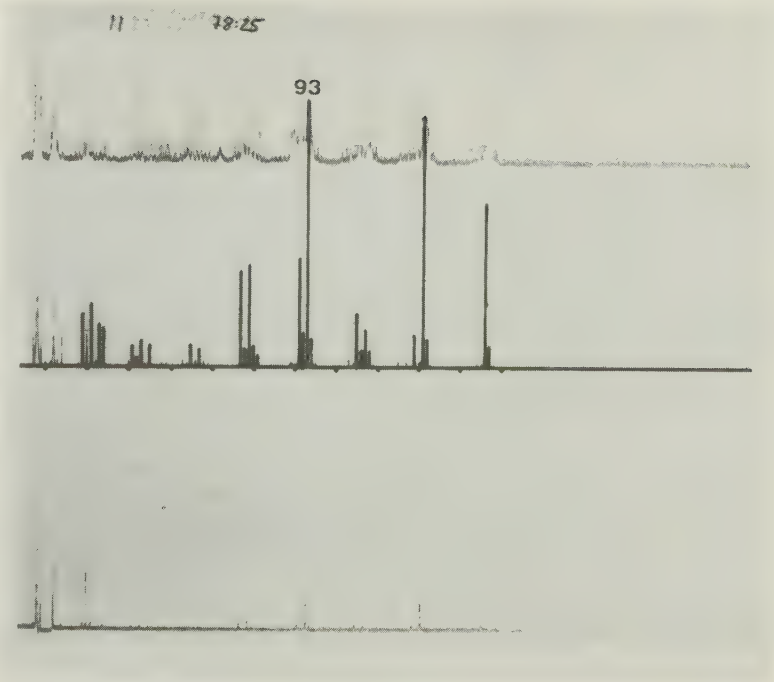
Figur 34. Kapillärgaskromatogram nr 77:190
Objekt: Färsk åbrodd (Artemisia abrotanum), hel kvist
Adsorption: 30 min., OV-17 på glasfiberpapper, 0,2 g
Desorption: 12 min., 150° C
Kolonn: Carbowax 20M WCOT, 130 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 50 till 200° C
Jonisation: 70 eV, 60 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta/min)



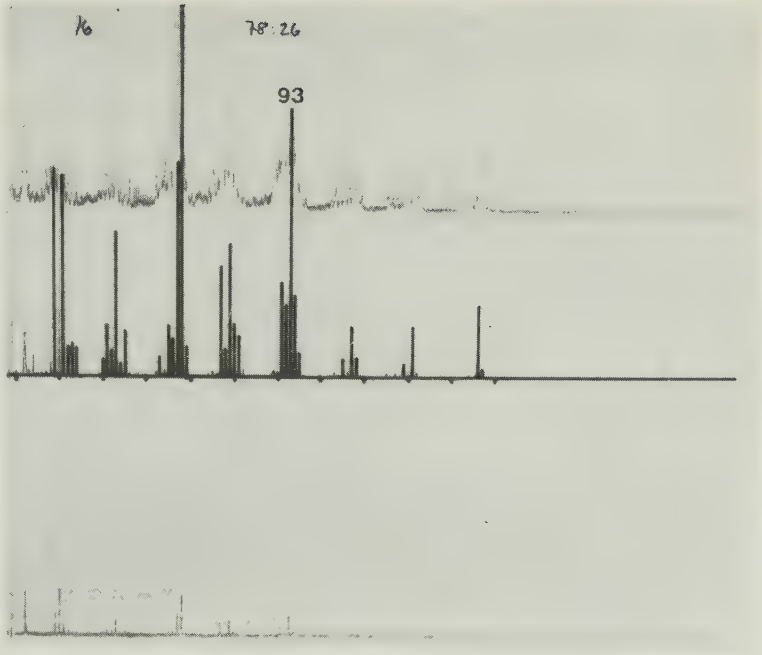
Figur 35. Kapillärgaskromatogram nr 78:12
Objekt: Djupfrysta fläderblad (Sambucus nigra)
Adsorption: 60 min., SE-30 på glasfiberpapper, 0,2 gram
Desorption: 15 min., 150° C
Kolonn: Carbowax 20M WCOT, 130 meter
Temperaturprogrammering: 2° C/min från 50 till 200° C
Jonisation: 70 eV, 300 uA, joner under 32 m/e diskriminerade
Pappershastighet: 10 mm/min (1 ruta motsvarar 1,5 min.)



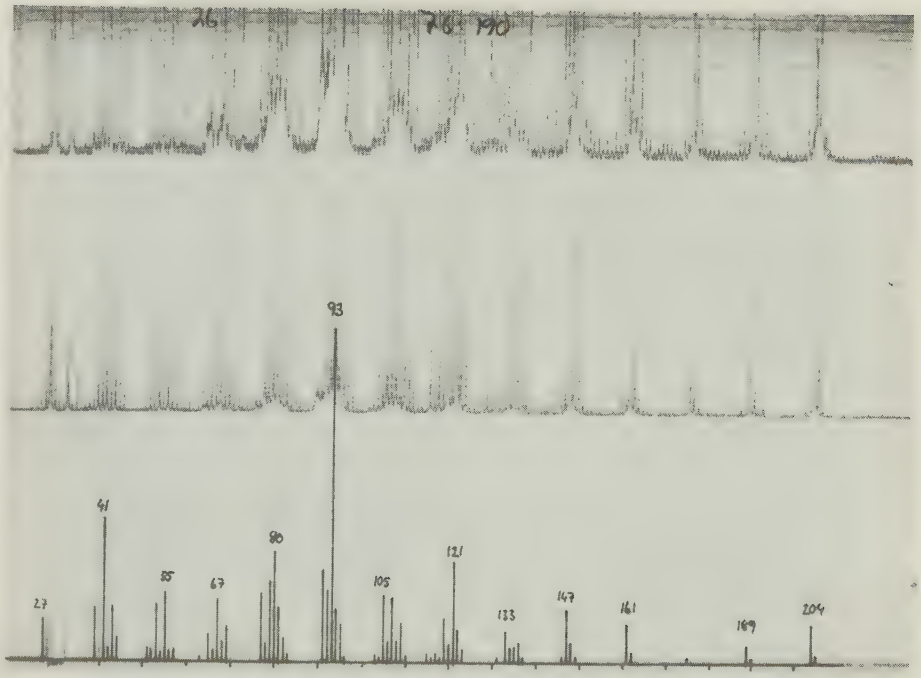
Figur 36. Masspektrum nr 78:2 (19)
Objekt: Gyllenlack enligt figur 28
Kromatografifraktion: A
Identifiering: 3-methylthiopropyl isothiocyanate
$CH_3S(CH_2)_3NCS$, molekylvikt 147, ref(214)
Jonisation: 70 eV, 300uA, temperatur i jonkällan 150° C.



Figur 37. Masspektrum nr 78:25 (11)
Objekt: Tomat enligt figur 31
Fraktion: 6
Identifiering: α-terpinolen, $C_{10}H_{16}$, molekylvikt 136
Jonisation: 70 eV, 300 uA, temperatur i jonkällab 150° C



Figur 38. Masspektrum nr 78:26 (16)
Objekt: Tomat enligt figur 31
Fraktion: 15
Identifiering: limonen, $C_{10}H_{16}$, molekylvikt 136
Jonisation: 70 eV, 300 uA, temeratur i jonkällan 150° C



Figur 39. Masspektrum nr 76:190 (26)
Objekt: Tomat enligt figur 30
Fraktion: 32
Identifiering: Humulen, $C_{15}H_{24}$, molekylvikt 204
Jonisation: 70 eV, 300 uA, temperatur i jonkällan 150° C

Tabell 1. Allelokemisk kommunikation mellan organismvärldens huvudgrupper

Avgivande grupp				Påverkad grupp: Mikroorganismer – Kärnlösa (Procaryota) A	Mikroorganismer – Kärnförsedda (Protista) B	Mikroorganismer – Svampar C	Växter D	Djur E
Mikroorganismer	Kärnlösa	1					Allelopatiska ämnen Marasminer Toxiner	Toxiner
Mikroorganismer	Kärnförsedda	2		Allelopatiska ämnen Antibiotika			Allelopatiska ämnen Marasminer Toxiner	Toxiner
Mikroorganismer	Svampar	3					Allelopatiska ämnen Marasminer Toxiner	Toxiner
Växter		4		Allelopatiska ämnen Fytoncider Fytoalexiner Infektionsförsvar	Allelopatiska ämnen Fytoncider Fytoalexiner Infektionsförsvar	Allelopatiska ämnen Fytoncider Fytoalexiner Infektionsförsvar	Allelopatiska ämnen Koliner	Växternas självförsvar mot växtätare
Djur		5		Infektionsförsvar	Infektionsförsvar	Infektionsförsvar	Ex. Gallframkallande ämnen	Aposematiska ämnen

Tabell 2

Ett förslag till en enhetlig terminologi för kemiska signaler. Termerna avse de olika positiva och negativa stimuli, som påverkar ett visst beteendemönster, en fysiologisk process eller en utvecklingsprocess.

Svar	Aktivatorer +	Repressorer -
Avståndsorientering	Attrahent	Repellent
Närorientering	Arrestant	Repellent
Påbörjande	Incitant	Supressent
Fortsättande/Avslutande	Stimulant	Deterrent
Sammanbrott		gifter

Modifierat från en tabell över kemiska stimuli som påverkar ätbeteendet, Lindstedt 1971 (19).

Tabell 3

Tomat (Solanum lycopersicum)
Bladdoftens inverkan på äggläggningen hos kålfjäril, (Pieris brassicae).
Tvåvalskammare IV (fig 1)
6 st 10 ul kapillärer med filtrerad bladsaft i doftgivaren.

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
195	112	7	328	16
196	167	4	157	17
197	35	1	81	4
198	24	3	249	20
199	84	6	113	12
200	57	3	90	6
201	21	2	119	5
204	78	2	127	6
205	79	2	220	12
206	94	6	156	10
207	61	6	204	7
208	89	4	124	9
209	185	4	209	10
210	229	6	470	19
S:a	1315	56	2647	153

Tabell 4

Tomat (Solanum lycopersicum)
Tvåvalskammare IV
Inverkan av bladdoft och kontaktkemoreception på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).
6x10 ul centrifugerad bladsaft i doftgivaren på ena sidan av kammaren. 0,25 ml bladsaft penslades direkt på kålbladet på den andra sidan.

Exp nr	Test "doft + smak"		Kontroll "doft"	
	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
359	0	0	252	8
360	0	0	187	14
362	0	0	411	22
363	0	0	75	10
S:a	0	0	925	54

Tabell 5

Tomat (Solanum lycopersicum)
Tvåvalskammare IV
Inverkan av den vattenlösliga fraktionen av centrifugerad bladsaft på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).

Exp nr	Växtextrakt	Test		Kontroll	
		ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
212	6x10 ul vattenl. återstod efter 2 ggr extraktion med eter	129	6	94	4
213	- " -	103	5	133	4
214	- " -	0	0	38	2
217	- " -	23	2	65	4
218	6X10 ul vattenl. överfas Folch	106	5	132	5
219	- " -	162	10	71	9
220	6X10 ul vattenl. återstod efter 2 ggr extraktion med hexan	69	3	100	3
221	- " -	71	5	57	5
	S:a	663	36	690	36

Tabell 6

Tomat (Solanum lycopersicum)
Tvåvalskammare IV och V (fig 2)
Extraherade fraktioner av centrifugerad tomatbladspress-saft. Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).
0,25 ml av lösningen penslades på testkålbladet, motsvarande mängd av lösningsmedlet penslades på kontrollbladet.

Exp nr	Lösningsmedel	Test		Kontroll	
		ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
411	paraffinolja	77	15	54	5
412	"	132	6	168	12
413	"	34	7	58	4
414		0	0	89	8
	S:a	243	28	369	29
415	tricaprylin	159	5	113	13
416	"	176	8	537	19
417	"	13	5	184	10
418	"	34	5	10	2
	S:a	382	23	844	44
419	diisodecylftalat	113	1	224	16
420	"	85	9	146	8
421	"	0	0	0	0
422	"	37	5	0	0
	S:a	235	14	370	24

Tabell 7

Tomat (Solanum lycopersicum)
Tvåvalskammare IV och V.
Vattenfas efter pentanextraktion av centrifugerad bladsaft. Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).
0,25 ml av vattenfasen penslades direkt på testbladet, motsvarande mängd vatten (skakat med pentan) på kontrollbladet.

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
427	26	1	221	10
428	0	0	218	3
429	16	2	1	1
430	0	0	0	0
431	0	0	171	9
432	0	0	120	2
433	29	2	92	4
434	0	0	15	3
S:a	71	5	838	32

Tabell 8

Tomat (Solanum lycopersicum)
Tvåvalskammare IV och V
Vattenfas efter Folch-fördelning av centrifugerad tomatbladspressaft. Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).
0,25 ml av vattenfasen penslades direkt på testkålbladet, motsvarande mängd vatten skakat med kloroform och metanol på kontrollbladet.

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
435	10	2	76	29
436	0	0	0	0
437	18	1	51	1
438	0	0	0	0
439	0	0	62	11
440	0	0	0	0
441	39	8	111	14
442	8	6	93	8
443	14	14	110	21
444	0	0	0	0
445	0	0	81	2
446	218	12	240	8
447	53	1	22	3
448	63	1	39	1
449	0	0	111	11
450	24	3	387	10
451	0	0	81	4
452	0	0	46	3
453	14	3	54	13
454	184	6	272	19
455	0	0	24	1
456	3	2	81	6
457	6	2	157	10
458	75	3	367	17
S:a	729	64	2466	192

Tabell 9

Tomat (Solanum lycopersicum)
Tvåvalskammare IV och V
Centrifugerad bladsaft från djupfrysta blad. Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).
0,25 ml penslades på testkålbladet.

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
423	0	0	68	8
424	0	0	115	3
425	51	2	41	3
426	0	0	24	3
S:a	51	2	248	17

Tabell 10

Linalol
Tvåvalskammare IV och V
Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae). 10 ul i en mikrokapillär placerades i doftgivaren på ena sidan av kammaren.

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
276	63	6	43	6
277	49	6	68	6
278	30	5	231	13
279	37	4	63	17
280	87	9	32	10
281	81	6	114	16
282	22	7	17	2
283	49	6	99	16
S:a	418	49	667	86

Tabell 11

Linalol
Tvåvalskammare V
Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae). 0,25 ml av linalol 1:100 i hexan penslades på testkålbladet.

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
475	0	0	19	1
476	13	1	194	17
477	0	0	0	0
478	0	0	26	2
485	0	0	44	8
486	34	1	56	19
487	0	0	0	0
488	3	1	123	4
489	0	0	0	0
490	18	1	4	4
491	0	0	35	3
492	50	2	0	0
S:a	118	6	501	(58)

Tabell 12

Linalol

Försöket utfördes i odlingsburarna. Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).

1 % linalol i vatten. Sepahdex G-200 (Försök 497) och diisodecylftalat (498) prövades som doftkvarhålllare. I försök 498 var försökstiden 5 tim. Efter halva tiden fick testkålbladet och kontrollkålbladet byta plats.

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
497				
Bur 1	137	12	32	7
" 2	20	3	24	8
" 3	170	7	107	8
S:a	327	22	163	23
498				
Bur 1 a)	0	0	61	6
b)	75	3	0	0
" 2 a)	132	12	199	8
b)	45	5	76	13
" 3 a)	34	1	155	30
b)	140	5	98	3
" 4 a)	112	3	338	45
b)	300	22	383	18
" 5 a)	131	14	361	62
b)	283	35	76	12
" 6 a)	22	2	42	3
b)	0	0	15	4
S:a	1274	102	1812	204

Tabell 13

Gyllenlack (Cheiranthus cheirii)
Tvåvalskammare IV och V
Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).
0,25 ml centrifugerad bladsaft penslades på testkålbladet.

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
294	0	0	62	3
296	0	0	249	12
298	0	0	66	4
299	0	0	200	10
300	0	0	154	9
315	0	0	132	8
S:a	0	0	863	46

Tabell 14

Gyllenlack (Cheiranthus cheirii)
Tvåvalskammare IV och V
Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).
Extrakt med polära viskösa oljor av centrifugerad bladsaft.
0,25 ml av lösningen penslades på testkålbladet.

Exp nr	Lösningsmedel	Test		Kontroll	
		ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
306	Apiezonolja	0	0	16	1
307	paraffinolja	2	1	232	13
308	"	63	2	78	5
316	kaprylin	68	2	129	7
317	"	0	0	254	12
+ 318	"	0	0	102	12
+ 319	"	0	0	74	1
+ 320	"	0	0	103	2
+ 324	"	0	0	1021	28
	S:a	133	5	2009	81

+ Dessa försök utfördes ej i tvåvalskammare utan genom att testblad och kontrollblad sattes in i en av de stora odlingsburarna.

Tabell 15
Gyllenlack (Cheiranthus cheirii)
Tvåvalskammare V
Inverkan på äggläggningen hos rapsfjäril (Pieris napi).
0,25 ml saft från första årets bladrosett penslades på testkålbladet. Denna art placerar inte äggen i samlingar utan spridda.

Exp nr	Test ägg	Kontroll ägg
557	0	45
558	1	6
559	0	74
560	0	36
561	0	14
S:a	1	175

Tabell 16

Trädgårdstimjan (Thymus vulgaris) och backtimjan (Thymus serpyllum)

Tvåvalskammare V (försök 459-460, 461-464, 463-470)

Odlingsburarna (försök 508-510, 499)

Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae). Sephadex gel och diisodecylftalat prövades som doftkvarhållare. Lösningarna penslades på testkålbladet.

Exp nr		Test ägg	Test äggsaml	Kontroll ägg	Kontroll äggsaml
459-460	Thymus vulgaris Vattenextrakt (7 g färska frusna skott homogeniserades i 100 ml dest vatten)	220	6	201	19
461-464	Vattenextrakt + Sephadex G-200	357	10	430	27
465-470	Vattenextrakt + Sephadex G-100	283	23	827	39
508-510	0,3 g torkat växtmaterial i 6 g diisodecylftalat	228	82	422	107
	S:a	1086	131	1880	192
499	Thymus serpyllum 0,3 g torkade skott i 6 g diisodecylftalat	793	70	1205	235

Tabell 17

Lomme (Capsella bursa pastoris)
Tvåvalskammare V
Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).
0,25 ml centrifugerad bladsaft penslades på testkålbladet.

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
519	112	2	0	0
520	74	6	0	0
521	0	0	0	0
522	0	0	17	3
S:a	186	8	17	3

Tabell 18

Fläder (Sambucus nigra)
Tvåvalskammare V
Inverkan av bladdoft och kontaktkemoreception (försök 562 -565) och enbart bladdoft (försök 566-573) på äggläggningen hos rapsfjäril (Pieris napi).

0,25 ml bladsaft penslades på testkålbladet.

Exp nr	Test ägg	Kontroll ägg
562	1	55
563	4	47
564	0	40
565	1	23
S:a	6	165

5 x 10 ul bladsaft i doftgivaren

566-573	226	144

Tabell 19

Benzaldehyd

Tvåvalskammare

Inverkan på äggläggningen hos rapsfjäril (Pieris napi).

Exp nr	Applicering	Test ägg	Kontroll ägg
574	10 ul i doftgivaren	49	18
575	0,25 ml mättad vattenlösning	20	56
576	-"- ny påpensling varje timme	40	83
577	-"-	17	13
578	testkålbladet med basen i mättad lösning	18	25
579	kålbladet nedsänkt i mättad lösning (20 tim före försöket)	8	30
580	= 578 + injektion av 5 ul i bladet	25	60
581	5 ul injic. i bladet	22	34
582	10 ul "	13	33
538	2 ul "	13	3
584	" "	15	6
585	10 ul	41	1
		281	362

Tabell 20

Växter med uppgiven deterrentverkan på äggläggande kål-fjärilar (Pieris brassicae).

1.	Solanum lycopersicum - tomat	Solanaceae
2.	Nicotiana - tobak	"
3.	Sambucus nigra - fläder	Caprifoliaceae
4.	Sambucus racemosa - druvfläder	"
5.	Artemisia absinthium - malört	Compositae
6.	Artemisia abrotanum - åbrodd	"
7.	Seneccio jacobaea - ståndsl	"
8.	Salvia officinalis - salvia	Labiatae
9.	Thymus vulgaris - timjan	"
10.	Mentha piperita - pepparmynta	"
11.	Allium - lök	Liliaceae
12.	Genista - ginst	Leguminosae
13.	Mimosa	Mimosaccae
14.	Cheiranthus Cheirii - gyllenlack (lackviol)	Cruciferae
15.	Cheiranthus Allionii - sommarkårel	"
16.	Asclepias currasavica	Asclepiadacea
17.	Calotropis	"
18.	Hoya (H. carnosa) - porslinsblomma	"
19.	Gomphocarpus	
20.	Stephanotis	
21.	Nerium (N. oleander) - oleander, rosenlager)	Apocyanaceae
22.	Euphorbia	
23.	Digitalis purpurea - fingerborgs-blomma	Scrophulariacea
24.	Cannabis sativa - hampa	Cannabaceae
25.	Tagetes - sammetsblomster	Compositae

Tabell 21

År	Problematik	Högkokande vätskor	Bärare	Ref
1958	Korta kolväten i bilavgaser och luft	Dimetylsulfolan	Tegelpulver	126 a
1959	Luftföroreningar	Di-n-butylftalat	Sil-O-Cel C22	100
1960	Vatten i butan	Polyetylenglykol	Tegelpulver	126 b
1962	Cyanväte i luft	Dinonylftalat	Tegelpulver	127
1963	Toxiska organiska luftföroreningar	Silikonelastomer E301, Polyetylenglykol 400	Celite 545	128
1963	Naftalen, tiofen i luft	Silikonolja	Chromosorb P	129
1963	Luftföroreningar	Carbowax 1540	Tegelpulver	130
1965	Luftföroreningar	Silikonelastomer E301, Polyetylenglykol 400	Celite 545	131
1965	Luftföroreningar	D-n-butylftalat	Chromosorb P	132
1965	Luftföroreningar	Polyetylenglykol 400, dinonylftalat, Apiezon L	Celite	133

Tabell 21 forts

År	Problematik	Högkokande vätskor	Bärare	Ref
1966	Insektsferomoner	Silikonolja DC550, m-fenyleter, neopentylglykol-adipat, neopentylglykol-succinat,	Chromosorb A	134
1966	Kolväten i bilavgaser	Apiezon J	Chromosorb P	124
1966	Doftsignaturer från föremål och levande varelser	Apiezon	Telfon,glas	135
1966	Luftburen kemisk information	Apiezon L, dietylenglykol-adipat	Telfon,glas	136
1966	Feromoner	Silikonfett	Chromosorb W	137
1967	Bensenderivat i luft	Silikonelastomer E301	Celite 545	139
1967	Organiska modellsubstanser i luft	Silikonolja SE-30	Kiselgur	140
1968	Insektsferomoner	Carbowax 20 M	Silikagel	141
1968	Kolväten i metan	Carbowax 20 M	Aluminium-oxid	142
1968	Luftburen kemisk information	Apiezon L	Fluoropak 80	143

Tabell 21 forts

År	Problematik	Högkokande vätskor	Bärare	Ref
1968	Insektsferomoner	Fett, talg	Glas	144
1968	Pesticider i luft	Glycerin	Nylonnät	145
1968	Tetraetylbly i luft	SE-52	Chromosorb P	146
1968	Insektsferomoner	OV-17	GasChrom Q	147
1968	Insektsferomoner	Lanolin	Tyg	148
1970	Lågmolekylära organiska föreningar i förbränningsavgaser	Sukrosacetat	Gas Chrom Z	149
1971	Pesticider i luft	Etylenglykol	Tyg	150
1971	Merkaptaner i luft	Mjölkfett	Mjölk	151
1971	Kolväten i luft	Carbowax 1540	Gas Chrom Z	152
1972	Halotan i luft	Apiezon K	Porapak P,Q	153
1972	Klorerade kolväten i luft	SE-30	Nylonnät	154
1973	Aromämnen i luft	Vegetabiliska oljor		155
1973	Metylketoner i luft	Grädde	Grädde	156

Tabell 21 forts

År	Problematik	Högkokande vätskor	Bärare	Ref
1973	Tetracyliska kolväten i luft	Trikaprylin	Glasfiber-papper	157
1973	Flyktiga föreningar från orkidéer	Convalex 10	Glasfiber-papper	158
1973	Flyktiga luftföroreningar	Dexsil GC300, Silikonolja DC200	Chromosorb W	159
1973	Feromoner	Silikonfett	Chromosorb G	160
1974	Aromämnen i luft	Lipider	Livsmedel	161
1974	Luftföroreningar	Dexsil GC300, XE-60	Chromosorb G	162
1975	Luftföroreningar	Carbowax 600, Didecylftalat, Trikresylfosfat	Chromosorb W, Chromosorb P, Chromosorb W	163
1975	Luftföroreningar	Silikonolja DC 200	Chromosorb W	164
1975	Spårsubstanser i gaser	Ättikssyra		165
1977	Aromämnen i luft	Lipider	Livsmedel	166

Tabell 22

År	Problematik	Syntetiska fasta polymerer	Ref
1968	Halogeninnehållande kolväten, kolväten i luft	Porapak Q, S	170
1971	Doft från blåluzern	Chromosorb 102	171
1971	Organiska föreningar i luft	Chromosorb 102	167
1972	Flyktiga föreningar ur alkoholhaltiga drycker	Porapak Q	172
1972	Halotan i luft	Porapak P, Q	153
1972	Artefakter från Porapak Q	Porapak Q	173
1972	Formaldehyd i luft	Porapak Q	174
1973	Flyktiga föreningar ur urin	Porapak P, TENAX GC	175
1973	Flyktiga metaboliter ur urin	TENAX GC	176
1973	Flyktiga luftföroreningar	TENAX GC	159
1973	Kolväten i luft	Chromosorb 102	177
1973	Luftföroreningar	Chromosorb 102	178
1973	Organiska luftföroreningar	Chromosorb 101, 105, TENAX GC	179
1973	Bis (klorometyl)-eter	Chromosorb 101	180
1974	Pesticider i luft	Chromosorb 102	181
1974	Kolväten i luft	Chromosorb 102	182

Tabell 22 forts

År	Problematik	Syntetiska fasta polymerer	Ref
1974	Aromämnen ur livsmedel	Porapak Q	183
1974	Flyktiga modellsubstanser i luft	TENAX GC	184
1974	Organiska luftföroreningar	TENAX GC	185
1974	Föroreningar i luft	TENAX GC	189
1974	Flyktiga modellsubstanser	TENAX GC	186
1974	Adsorptionsegenskaper hos TENAX GC	TENAX GC	187
1974	Luftföroreningar	Porapak Q	162
1974	Oxazoler och tiazoler ur luft	Porapak Q	188
1975	Toxiska luftföroreningar	Porapak Q, TENAX GC, Chromosorb 101	190
1975	Organiska föreningar i luft	TENAX GC, XAD-2	191
1975	Organiska luftföroreningar	TENAX GC, Porapak Q, Chromosorb 101, 104	163
1975	Organiska luftföroreningar	TENAX GC	169
1975	Organiska luftföroreningar	Porapak Q	192
1975	Lågmolekylära urinmetaboliter	TENAX GC	193

Tabell 22 forts

År	Problematik	Syntetiska fasta polymerer	Ref
1975	Industriella luftföroreningar	TENAX GC	194
1975	Luftföroreningar	Porapak N, R, TENAX GC	164
1976	Jämförande försök med flyktiga modellsubstanser	Chromosorb 101,102, Porapak P, Q, R, T, TENAX GC	195
1976	Flyktiga modellsubstanser	TENAX GC	196
1976	Organiska luftföroreningar	TENAX GC	197
1977	Artefakter från TENAX GC	TENAX GC	198
1977	Luftburna doftsubstanser	Chromosorb 102, 105, 106, TENAX GC	199

Tabell 23

Smörsyra
Tvåvalskammare IV och V
Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).
0,25 ml av smörsyrelösningen penslades på testkålbladet.

0,1 % smörsyra i vatten

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
393	233	8	200	6
394	0	0	143	5
395	249	12	123	4
396	0	0	0	0
S:a	482	20	466	15

1 % smörsyra i vatten

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
397	156	8	111	8
398	0	0	31	3
399	96	4	67	2
400	52	5	267	8
S:a	304	17	476	21

Tabell 24

Smörsyra
Försöken utfördes i odlingsburarna.
Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).
0,25 ml av lösningen penslades på testkålbladet.

A. 0,1 % smörsyra i vatten

Exp nr		Test ägg	Test äggsaml	Kontroll ägg	Kontroll äggsaml
493	a	25	9	293	20
"	b	582	57	700	44
"	c	67	18	370	23
"	d	302	31	326	12
"	e	571	31	595	52
"	f	647	22	263	22
	S:a	2194	168	2547	173

B. 0,1 % smörsyra i diisodecylftalat

494	a	215	42	112	21
"	b	632	52	364	32
"	c	285	25	75	12
"	d	853	84	1021	62
"	e	525	28	288	17
"	f	257	15	414	54
	S:a	2767	246	2274	198

Tabell 25

Smörsyra
Försöken utfördes i odlingsburarna.
Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).
1 % smörsyra i vatten penslades på testkålbladen.

Exp nr		Test		Kontroll	
		ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
495	a	69	20	188	15
"	b	86	15	108	27
"	c	115	16	381	38
"	d	92	19	334	52
"	e	323	79	238	44
"	f	45	17	131	20
496	a	0	0	262	43
"	b	49	12	77	39
"	c	301	20	145	25
"	d	134	15	395	42
"	e	376	79	233	59
"	f	33	4	109	24
	S:a	1623	296	2601	428

Tabell 26

Linalol + smörsyra
Försöken utfördes i odlingsburarna.
Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae).
En blandning av lika delar av 0,2 % linalol och 1 % smörsyra penslades på testkålbladet.

Exp nr	Test		Kontroll	
	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
502				
Bur 1	19	5	4	2
" 2	14	5	47	5
" 3	22	10	81	20
" 4	109	14	131	25
504				
Bur 1	2	2	32	12
" 2	20	1	38	7
" 3	10	5	12	6
" 4	20	6	27	15
S:a	216	48	372	92

Tabell 27

+ Limonen

Tvåvalskammare V

Doftens inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (*Pieris brassicae*).

En bit glasfiberpapper som impregnerats med några droppar av limonen placerades vid basen av testkålbladet.

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
547	13	1	9	9
548	0	0	0	0
549	42	2	66	9
550	1	1	83	9
551	93	11	38	11
552	0	0	49	8
S:a	149	15	245	46

Tabell 28

Trans-hex-2-enal, "bladaldehyd"
Tvåvalskammare V
Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae)

A. 6 x 10 ul i kapillärer i doftgivaren

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
347	19	10	35	1
354	218	20	54	7
355	191	17	96	9
356	146	19	60	13
357	202	9	56	6
358	43	6	197	5
S:a	819	81	498	41

B. 0,1 % i vatten penslades på teskålbladet

381	0	0	197	9
382	0	0	77	1
389	108	3	142	8
390	32	3	389	31
391	19	2	10	1
392	44	5	55	8
S:a	203	13	870	58

Tabell 29

Cis-hex-3-enol-1,"bladalkohol"
Tvåvalskammare V
Inverkan på äggläggningen hos kålfjäril (Pieris brassicae). 6 x 10 ul av substansen applicerades i kapillärer i doftgivaren.

Exp	Test		Kontroll	
nr	ägg	äggsaml	ägg	äggsaml
346	21	12	57	9
348	7	1	88	6
349	0	0	0	0
350	31	3	134	13
351	112	4	144	7
352	164	9	100	17
353	43	1	115	10
S:a	378	30	638	62

LF/ALLF 158 78 036

LiberTryck Stockholm 1978